

ARTICLE PRINCIPAL

RECOUVRANT EN PARTIE
LA THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE
A L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
(PARIS VI)

PAR
CLAIRE BERKALOFF

POUR OBTENIR
LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la thèse :

Évolution de l'ultrastructure, de la pigmentation et de l'activité
photosynthétique de l'algue verte *Protosiphon botryoïdes* (Kütz) Klebs
en ~~sa~~ culture.

Soutenue le 30 Juin 1975, devant la Commission d'examen.

M. BUVAT
Mme PUISEUX-DAO
M. GIRAUD
M. MOYSE
M. MAZLIAK

PARIS
1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. : AO 11493

ARTICLE PRINCIPAL

RECOUVRANT EN PARTIE
LA THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE
A L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
(PARIS VI)

PAR
CLAIRE BERKALOFF

POUR OBTENIR
LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la thèse :

**Évolution de l'ultrastructure, de la pigmentation et de l'activité
photosynthétique de l'algue verte *Protosiphon botryoïdes* (Kütz) Klebs
en ~~une~~ culture.**

Soutenue le 30 Juin 1975, devant la Commission d'examen.

**M. BUVAT
Mme PUISEUX-DAO
M. GIRAUD
M. MOYSE
M. MAZLIAK**

PARIS
1975



MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALE DU PLASTE
ET DE DIVERS AUTRES ORGANITES CELLULAIRES
AU COURS DU DÉVELOPPEMENT
ET DE L'ENKYSTEMENT
DU *PROTOSIPHON BOTRYOÏDES* (CHLOROPHYCÉES)

Claire BERKALOFF

Laboratoire de Botanique et de Physiologie végétale,
Ecole Normale Supérieure, Paris

L'algue verte siphonnée *Protosiphon botryoïdes* vit normalement dans les sols humides. Elle peut être cultivée au laboratoire, sur milieu gélosé. En 1933, Bold a décrit en détail son cycle de vie; ce cycle est d'ailleurs susceptible de nombreuses variations suivant les conditions de culture : en effet, comme beaucoup d'organismes habitant des biotopes dont l'équilibre est temporaire, le *Protosiphon botryoïdes* est capable de s'enkyster lorsque les conditions deviennent défavorables, en particulier en cas de dessèchement du milieu. Les mêmes individus de *Protosiphon botryoïdes*, obtenus par la croissance de jeunes zoospores, ou de zygotes, et parvenus, après quelques jours de croissance, à un stade siphonné, peuvent donc évoluer de plusieurs façons différentes :

a. — Si les conditions d'hygrométrie demeurent constantes et favorables, les jeunes algues continuent à croître en conservant une structure siphonnée; la taille de chaque individu peut alors atteindre plusieurs millimètres.

b. — Soumis à une brusque submersion, ces mêmes thalles sont susceptibles de se fractionner en une multitude de zoospores ou de gamètes

* Cet article recouvre en partie le travail d'une thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles qui sera soutenue à la Faculté des Sciences de Paris au cours de l'année 1968.

qui se dispersent dans l'eau et donnent naissance à de nouveaux individus.

c. — Au contraire, sous l'action d'un lent dessèchement, les algues passent à l'état de repos, en se transformant, parfois après fragmentation interne, en kystes sensiblement sphériques : cette évolution demande un éclaircissement suffisant et s'accompagne d'un changement de couleur de la culture qui devient orangée, puis rouge.

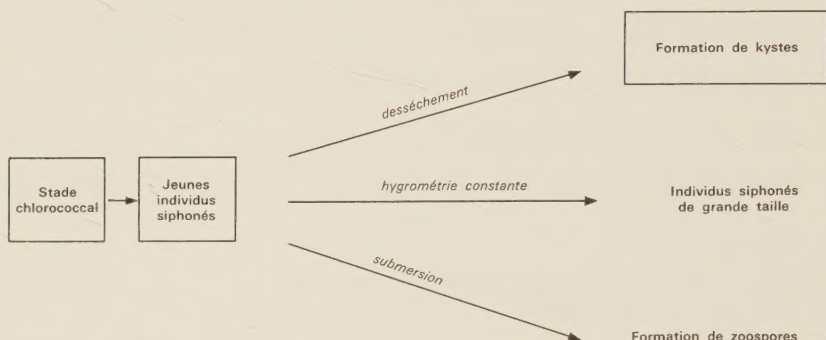


FIGURE 1. Divers types possibles d'évolution du *Protosiphon botryoides* à partir d'un jeune individu sphérique. Les stades encadrés correspondent à ceux étudiés dans cet article.

C'est ce troisième type d'évolution : la croissance puis l'enkystement de jeunes individus soumis à un dessèchement progressif, que nous avons étudié du point de vue de l'évolution des ultrastructures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

a. — CULTURE

La souche que nous avons utilisée provient de la collection d'algues de l'Université d'Indiana : *Protosiphon botryoides* (Kutz) Klebs (99).

Les algues sont cultivées sur gélose, en tube ou en boîte de Petri, sur le milieu suivant (milieu de Bristol : Starr, 1961).

Na NO ₃	0,25 g	K ₂ H PO ₄	0,075 g
Ca Cl ₂	0,025 g	Na Cl	0,025 g
Mg So ₄ , 7 H ₂ O	0,075 g	Fe Cl ₃	1 goutte
K H ₂ PO ₄	0,175 g	Agar	15 g
		Eau distillée	1 000 cc

Les cultures sont soumises à un rythme journalier de 12 h d'éclairement pour 12 h d'obscurité. L'intensité lumineuse est de l'ordre de 2 500 Lux. La température est voisine de 25 °C. Dans ces conditions, l'évolution depuis le repiquage de jeunes individus verts jusqu'à l'enkystement complet demande environ deux mois.

b. — FIXATION ET INCLUSION

Les échantillons ont été fixés par le glutaraldéhyde postosmié. Selon les différents lots, les conditions de fixation ont varié à l'intérieur des limites suivantes :

- glutaraldéhyde : 0,5 à 4 % dans du tampon au cacodylate : 2 à 4 heures;
- rinçage dans le tampon au cacodylate : 2 à 20 heures;
- Os O₄ à 1 % dans du tampon au véronal : 1 heure.

Les pièces étaient ensuite déshydratées et incluses dans l'araldite. Les coupes, effectuées sur un microtome Servall, étaient contrastées au citrate de Plomb selon Reynolds (1963) et observées sur un microscope RCA - EMU 3 H.

RÉSULTATS

I. — STRUCTURE DES INDIVIDUS VERTS (Pl. I, fig. a)

a. — ASPECT GÉNÉRAL

I. *Stade chlorococcal* (Pl. I, fig. a)

Les jeunes individus, observés peu de temps après le repiquage, sont approximativement *sphériques* ou ellipsoïdes. Leur membrane externe est mince. Ils sont uninucléés : le noyau est de grande taille, approximativement central. A son voisinage, se trouvent un ou plusieurs saccules de réticulum endoplasmique qui l'entourent en partie, et quelques dictyosomes. Dans le cytoplasme périnucléaire se répartissent également des mitochondries. A ce stade, le plaste est pariétal formant une couche presque continue qui enveloppe les autres structures de l'algue. Le pyrénoloïde fait saillie dans le cytoplasme. Le système vacuolaire est réduit à quelques petites vacuoles. Lorsque le plan de coupe est favorable, on peut également, au voisinage du noyau, observer un ou deux

centrioles; sur la figure b (Pl. IV), on peut constater que ceux-ci sont constitués, comme les centrioles animaux, de neuf groupes de trois tubules formant un cylindre creux. La figure c (Pl. IV) montre deux de ces centrioles en coupe longitudinale.

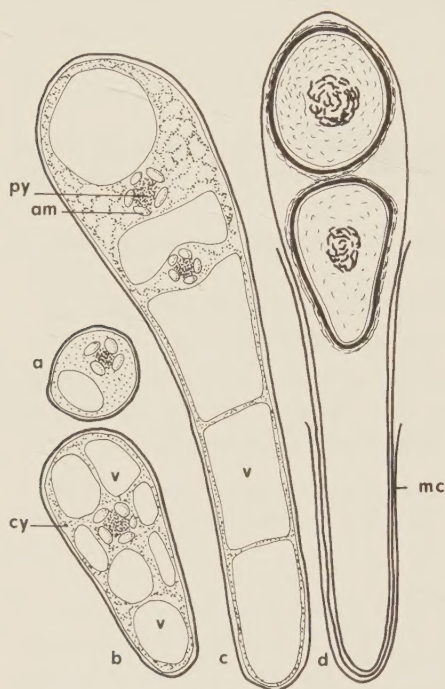


FIGURE 2. Aspet *in vivo* du *Protosiphon botryoides* à différents stades de son développement.

a, jeune individu sphérique; b, passage au stade siphonné; c, stade enkysté: deux kystes, encore contenus dans la paroi (mc) du siphon dont ils proviennent; v, vacuole; cy, cytoplasme de couleur généralement verte, contenant le plaste; py, pyrénioïde; am, amidon; mc, membrane pecto-cellulosique du siphon.

2. Stade siphonné (Pl. II)

Le stade chlorococcal que nous venons de décrire est assez fugitif. Rapidement, le noyau subit une ou plusieurs divisions, le système vacuaire se développe abondamment. Les individus les mieux développés acquièrent rapidement une structure siphonnée présentant une polarité marquée. En même temps, le plaste se ramifie dans les trabécules cytoplasmiques, prenant un aspect réticulé. Cette très fine réticulisation explique qu'à l'observation photonique, Bold (1933) n'ait pas pu distinguer précisément le plaste du cytoplasme.

b. — STRUCTURE DU PLASTE

Dans la description du plaste, nous nous conformerons à la nomenclature adoptée par Park (1966) d'après Menke et Weier. Nous appellerons donc

thylacoïdes les sacs aplatis limités par deux membranes parallèles soudées à leurs extrémités (structures qui sont parfois appelées aussi « disques » ou « saccules ») et nous désignerons sous le nom de « partition » les lamelles épaisses formées par l'accolement par leur face externe de deux membranes limitantes appartenant soit à deux thylacoïdes voisins et parallèles, soit aux replis d'un même thylacoïde.

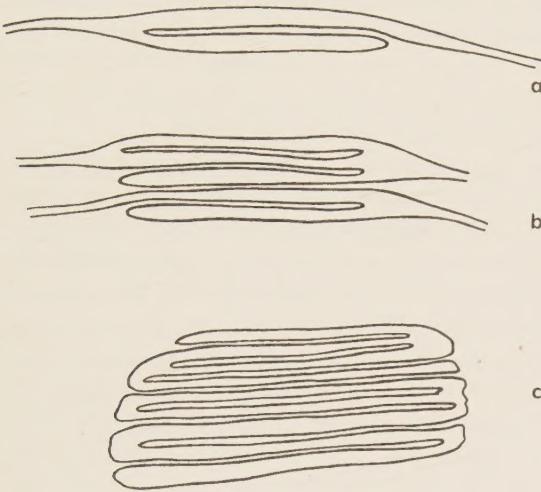


FIGURE 3. Interprétation schématique de la structure des pseudo-granums aux divers stades de leur formation : a, thylacoïde présentant une seule invagination; b, pseudo-granum d'une algue au stade siphonné (voir Planche III); c, pseudo-granum dans un kyste (voir Planches VII et VIII).

Dans les petits individus sphériques (Pl. I, fig. a), le plaste est parcouru par de longs thylacoïdes sensiblement parallèles à la surface externe. Mais la forme de ces thylacoïdes est plus complexe que celle le plus souvent observée chez les Algues vertes agraires. En effet, ils forment dans certaines zones des empilements qui, à première vue, ressemblent assez aux granums des végétaux supérieurs. Une observation plus précise permet de se rendre compte que la nature de ces empilements est, en réalité, assez différente. Les granums des végétaux supérieurs sont en général constitués par l'accolement de thylacoïdes courts et longs, de forme simple. Ici, au contraire, chaque thylacoïde présente un certain nombre de replis internes dont les deux feuilletts, étroitement accolés, forment autant de partitions (voir fig. b, Pl. III). Selon l'incidence de coupe, certaines de ces partitions peuvent apparaître comme complètement indépendantes du thylacoïde qui les englobe. Chaque « pseudo-granum » (selon le terme adopté par Lembi et Lang (1965) pour l'algue *Carteria*), peut ainsi être formé par un ou plusieurs thylacoïdes englobant chacun un certain nombre de ces « partitions ».

Cette structure « pseudo-granaire » est d'ailleurs plus facile à observer, et souvent plus développée, dans les individus siphonnés. Le nombre de « partitions » contenues dans chaque pseudo-granum peut être assez

important. Il arrive également que les thylacoïdes intergranaires disparaissent plus ou moins complètement (Pl. I, fig. b). Les pseudo-granums apparaissent alors complètement indépendants les uns des autres. Dans ce cas, la continuité du plaste réticulé n'est plus marquée que par la persistance de la membrane plastidale à double feuillet.

Le pyrénôïde des jeunes individus sphériques est analogue à celui de nombreuses algues vertes déjà décrites (Manton, 1966; Gibbs, 1962). Il comporte un stroma granuleux, entouré plus ou moins complètement de grains d'amidon et traversé de quelques thylacoïdes. La lumière de ces derniers est notablement plus large à l'intérieur du pyrénôïde que dans leurs prolongements dans le stroma normal du plaste.

Pendant la mise en place de la structure siphonnée, le pyrénôïde subit une ou plusieurs divisions. Son architecture devient souvent assez complexe. Les thylacoïdes qui les traversent peuvent être très nombreux, ramifiés, et même comporter des « pseudo-granums » analogues à ceux qui existent dans les autres zones du plaste (Pl. III, fig. a).

Au voisinage du pyrénôïde des individus jeunes, on observe souvent une zone de stroma très pauvre en thylacoïdes (voir Pl. I). Au début du stade siphonné, cette zone est occupée par de nombreux thylacoïdes très sinueux, en général groupés par deux (Pl. IV, fig. a).

II. — ENKYSTEMENT (Pl. V à IX)

Dans les conditions de culture utilisées, les individus siphonnés n'atteignent jamais un très grand développement. En effet, peu à peu, le milieu se dessèche et les algues réagissent à ces nouvelles conditions de vie en s'enkystant. Cet enkystement entraîne plusieurs modifications cytologiques importantes.

a. — A l'intérieur du siphon le cytoplasme se rétracte et se rassemble en un ou plusieurs éléments sphériques. Le système vacuolaire se réduit à de petites vacuoles globuleuses dans lesquelles on peut toujours observer un précipité dense (v, Pl. V et VI).

b. — La réticulisation du plaste s'accroît encore. Sur les sections, certaines de ses ramifications apparaissent très étroites, constituées par deux membranes plastidales à double feuillet, séparées seulement par une faible couche de stroma (Pl. VII et Pl. VIII, fig. b). On peut même observer parfois des associations de plusieurs de ces ramifications sous forme de bandes concentriques englobant une zone de cytoplasme dégénérescent. (Pl. VIII, fig. c). En d'autres points, les deux membranes s'écartent davantage, laissant place à des systèmes lamellaires : à ce

stade, ceux-ci présentent un aspect très particulier difficile à interpréter sans connaître les formes plus jeunes. En effet, les thylacoïdes intergranaires ont en grande partie disparu et les *pseudo-granums* forment des unités apparemment indépendantes entourées par une membrane de thylacoïde (Pl. VIII, fig. a). En même temps, ce phénomène d'enkystement se produisant à un assez fort éclaircissement, une assez grande quantité d'amidon s'accumule dans le plaste, d'une part autour du pyrénoloïde, d'autre part dans différentes zones du plaste, entre les groupes de lamelles.

c. — L'enkystement est d'autre part accompagné d'un changement de couleur de la culture qui devient d'abord orangée, puis rouge. Ce changement est dû à une *accumulation de pigments caroténoïdes dans le cytoplasme*. Observés au microscope électronique, ces pigments se présentent sous forme de plages denses aux électrons (g et g_1 , Pl. V, VI et VII); le contour de ces plages est relativement diffus, et aucune membrane ne les sépare du cytoplasme voisin. Elles sont souvent disposées en chapelets le long des ramifications du plaste. Certaines sont très sombres. D'autres, dans lesquelles l'accumulation du pigment ne fait sans doute que commencer, sont encore assez claires; on peut alors voir qu'elles englobent sans les déplacer les structures cytoplasmiques préexistantes (voir Pl. VII). La taille des grains de pigment est très variable suivant les individus (Pl. VI, fig. a et b). Au début de l'accumulation, le pigment se présente parfois sous forme de nombreux globules de petite taille; d'autres fois, il se groupe en quelques grains plus volumineux. Jusqu'ici, nous n'avons pas pu établir de rapport net entre la taille des plages de pigment et le stade d'accumulation.

Dans les kystes provenant de cultures complètement rouges, le pigment occupe en général la majeure partie du volume cellulaire, mais il existe une grande variation individuelle. Dans certains, les plages de pigment ne couvrent guère que le tiers de la surface de la section. Dans d'autres (Pl. IX, fig. a), les plages sont pratiquement jointives. Entre elles persistent toutefois les organites cellulaires essentiels : réticulum endoplasmique, noyaux, mitochondries, dictyosomes, et aussi le plaste qui, bien que réduit en volume, est toujours présent et contient toujours des lamelles.

Enfin, le contenu de certains kystes paraît réduit à quelques très gros globules de pigment.

d. — Au cours de l'enkystement, la membrane externe de l'algue s'épaissit progressivement, par apposition de nombreuses couches concentriques. Elle atteint souvent une épaisseur de plusieurs μ . Les couches les plus externes sont souvent plus ou moins décollées et déchirées. En coupe tangentielle, les différentes couches apparaissent formées d'un

fin réseau de fibres entrelacées (Pl. IX, fig. c). On peut souvent distinguer une zone interne dense et une zone externe dont les couches sont beaucoup moins serrées.

DISCUSSION

Certaines des structures que nous venons de décrire appellent des commentaires.

I. — PRÉSENCE D'UN CENTRIOLE

La mise en évidence de cet organite confirme la description de la mitose chez le *Protosiphon* faite par Bold en 1933, où cet auteur indique qu'il existe un centrosome à chaque pôle du fuseau. Mais la faible taille de cet organite ne lui avait pas permis de déceler sa présence au stade quiescent.

D'après les études de microscopie classique, un centrosome existait dans diverses espèces de Chlorophycées. Il ferait, au contraire, défaut dans d'autres (voir bibliographie dans Fritsch, page 71). Mais, jusqu'à maintenant, la présence de cet organite n'a guère été confirmée à l'échelle électronique. Seule Manton (1964) étudiant les premiers stades de la germination de la zoospore de *Stigeoclonium*, a montré qu'après la disparition du flagelle, les bases flagellaires migrent au voisinage du noyau où elles joueraient le rôle de centrosome. Mais cet auteur ne précise pas si ce centrosome existe encore dans les individus plus âgés que les germinations au stade bi-cellulaire. Chez *Protosiphon*, nous avons pu retrouver cet organite même dans les individus enkystés. Lorsque l'étude ultrastructurale des algues vertes sera plus avancée, on peut espérer établir quels groupes sont ou non pourvus d'un centrosome. Ce caractère pourrait alors jouer un rôle dans la détermination de la position systématique d'algues dont l'appartenance à un groupe précis est encore incertaine, comme c'est le cas du *Protosiphon botryoïdes*. Ce caractère permettra peut-être de décider définitivement de l'appartenance du *Protosiphon* à l'ordre des Chlorococcales ou à celui des Siphonales.

II. — L'ULTRASTRUCTURE DU PLASTE ET SES MODIFICATIONS AU COURS DE L'ENKYSTEMENT

Le plaste des individus verts ressemble beaucoup à celui qui a été décrit par Lembi et Lang chez *Carteria* (1965). Certaines images de ces auteurs ressemblent de façon saisissante à ce que nous observons chez *Protosiphon*, et leur interprétation de la formation des pseudo-granums par invagination des thylacoïdes nous paraît tout à fait applicable à cette algue. Chez *Mougeotia*, Puiseux-Dao et Levain (1963) signalent aussi l'existence de quelques invaginations dans les thylacoïdes, mais les pseudo-granums paraissent dans ce cas beaucoup moins individualisés que dans le *Protosiphon*, tout au moins chez les individus cultivés dans des conditions normales. Drawert et Mix (1961a), chez *Micrasterias*, et Van Gansen et Boloukhère-Presburg (1965) sur *Acetabularia*, ont également indiqué l'existence de pseudo-granums, mais sans préciser leur mode de formation.

Toutefois, Lembi et Lang notent que la structure pseudo-granaire est plus ou moins développée suivant les espèces de Chlamydomonadines qu'ils étudient mais ne distinguent pas de différences suivant les différentes phases du cycle de ces espèces (sauf chez *Chlamydomonas* où les pseudo-granums, très peu développés, n'existeraient que chez les très jeunes individus). Nous avons remarqué, pour notre part, que l'individualisation des pseudo-granums est plus ou moins marquée suivant le stade de croissance de l'algue : les pseudo-granums, déjà visibles sur les jeunes individus, sont bien développés au stade siphonné. A ce stade, ils sont encore reliés entre eux par de nombreux thylacoïdes (Pl. III, fig. b). Dans les kystes rouges, les thylacoïdes intergranaires ont, en général, disparu et chaque pseudo-granum forme une unité indépendante (Pl. VIII, fig. a). Ce dernier aspect du plaste n'a guère été signalé jusqu'à maintenant dans d'autres algues. On ne peut le comparer qu'à certaines images de *Micrasterias* données par Drawert et Mix. Mais il nous est impossible de savoir si la structure de détail est la même dans les deux cas, Drawert et Mix n'ayant pas donné de clichés à fort grossissement.

Mais il existe aussi une variation individuelle importante. On peut ainsi observer de petits individus sphériques à pseudo-granums presque indépendants les uns des autres (voir Pl. I, fig. b). Au contraire, dans certains kystes, les thylacoïdes sont encore assez longs et moins ordonnés (Pl. VIII, fig. b). Drawert et Mix (1961), après avoir observé une variation analogue chez *Micrasterias*, ont établi, par diverses expériences, une corrélation entre le développement des pseudo-granums et divers troubles métaboliques, en particulier l'action des antibiotiques.

De même Puiseux-Dao montre, dans des plastes de *Mougeotia* soumis à l'action de la ribonucléase, l'existence de pseudo-granums beaucoup plus développés que dans les individus normaux. Or, dans les cultures de *Protosiphon* en cours d'enkystement, il existe toujours, à côté des individus sains, une proportion non négligeable d'individus en voie de dégénérescence. C'est toujours dans ces derniers que le processus d'individualisation des pseudo-granums est spécialement exagéré. En particulier, la lyse des thylacoïdes intergranaires ne semble se produire dans des individus siphonnés verts que dans des cas pathologiques.

Il semble donc que la structure en pseudo-granums reliés entre eux par des thylacoïdes intergranaires, voisine de celle décrite chez *Carteria*, soit la structure normale chez le *Protosiphon* vert. Chez certains individus verts dégénérescents ou subissant des troubles métaboliques, les pseudo-granums s'individualisent par disparition de thylacoïdes intergranaires. Ce phénomène apparaît de façon normale au cours de l'enkystement. Le rapprochement entre ces deux cas n'est pas tellement étonnant, si l'on pense que l'enkystement est un mode de défense de l'algue contre de mauvaises conditions de milieu.

III. — LE DÉPOT DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES

Nous avons vu que le ou les pigments caroténoïdes (probablement de l'astaxanthine (Bielig, 1947, bien que ceci soit contesté par Strain, 1951), qui s'accumulent au cours de l'enkystement apparaissent sous forme de plages sombres intracytoplasmiques, sans membrane limitante. Ce processus n'est donc pas comparable à l'accumulation de pigments caroténoïdes qui se produit dans certains organes de végétaux supérieurs, et qui est intraplastidale. Il ne s'agit pas, non plus, d'une accumulation vacuolaire. Ici, le pigment se mêle intimement aux structures cytoplasmiques et les englobe peu à peu (Pl. VII). Il serait intéressant de savoir si l'accumulation de pigment se fait à même le cytoplasme, ou est précédée par un dépôt de lipides. De tous façons, ce dépôt ne peut précéder de beaucoup celui du pigment, car les globules sombres sont encore assez peu abondants dans des kystes provenant de cultures déjà légèrement orangées.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence le mode d'élaboration du pigment. Tout au plus pouvons-nous noter que les plages de pigment apparaissent parfois préférentiellement au voisinage du plaste, souvent en longs chapelets entre deux diverticules de ce dernier. Peut-être le plaste joue-t-il un rôle dans cette synthèse; ceci paraît d'autant plus plausible que divers auteurs ont montré que la synthèse de ces xantho-

phylls nécessite un éclaircissement suffisant (Droop sur *Haematococcus*, Claes sur *Chlorella vulgaris*). Claes a pu préciser que chez *Chlorella vulgaris*, leurs précurseurs immédiats sont l' α et le β carotène (dont la synthèse nécessite l'intervention de la lumière).

Le pigment rouge déposé au cours de l'enkystement par diverses algues vertes est parfois considéré comme un déchet du métabolisme. Sur les clichés électroniques, on observe de nombreuses flaques de ce pigment rejetées tout à fait à la périphérie de la cellule, et faisant saillie sous la pellicule cytoplasmique.

Même dans une culture complètement desséchée, apparaissant très rouge à l'œil nu, le degré d'accumulation du pigment est assez variable suivant les individus. Il est permis de se demander si les kystes les plus chargés en caroténoïdes cytoplasmiques sont encore viables.

CONCLUSION

L'enkystement du *Protosiphon botryoides* s'accompagne de remaniement cellulaires importants. Si la condensation du cytoplasme, l'apparition de pigments caroténoïdes, l'épaississement de la membrane, sont facilement observables *in vivo*, l'étude au microscope électronique nous a permis de préciser plusieurs points, en particulier les rapports morphologiques des grains de pigment caroténoïde avec le reste du cytoplasme, la nature finement fibrillaire des diverses couches de la membrane, et surtout les remaniements considérables de la structure plastidale au cours de l'enkystement. Ces derniers rappellent d'ailleurs de façon curieuse ceux que l'on observe chez d'autres algues dans certains cas de troubles métaboliques. Il serait sans doute intéressant de savoir comment réagit le *Protosiphon* à des troubles du même type.

RÉSUMÉ

L'étude au microscope électronique nous a permis de mettre en évidence diverses particularités ultrastructurales du *Protosiphon botryoides*.

— Le plaste possède, déjà dans les jeunes individus verts, une structure « pseudo-granaire » qui s'accentue et se spécialise au cours de l'enkystement. En même temps, la réticulisation du plaste devient très complexe.

— L'astaxanthine, responsable du rougissement des kystes, se dépose sous forme d'amas intracytoplasmiques sans membrane limitante.

— Les diverses couches de la paroi pecto-cellulosique du kyste sont formées de courtes fibres entremêlées.

— Le *Protosiphon* possède des centrioles, de structure analogue à celle des centrioles animaux.

SUMMARY

The fine structure of the algae *Protosiphon botryoides* shows several interesting features.

— In the young green algae, the chloroplast thylakoids are grouped into pseudograna. This structure becomes more conspicuous and more complex during encystment.

— The red pigment, astaxanthin, forms intracytoplasmic deposits without membrane around them.

— The successive layers of the cyst wall are made of short intertwined fibers.

— Centrioles occur in *Protosiphon* and present the same structure than animal centrioles.

BIBLIOGRAPHIE

1. BIELIG H., 1948. Unpublished observations reported in Fiat Rev. German. Sci. Biochemistry, Parts I et IV.
2. BOLD H.C., 1933. The life history and cytology of *Protosiphon botryoides*. *Bul. Torrey Bot. Club*, **60**, 241-299.
3. CLAES H., 1959. Biosynthese von Carotinoiden bei *Chlorella*. V. Die Trennung von Licht und Dunkelreaktion bei der lichtabhängigen Xanthophyllsynthese von *Chlorella*. *Z. Naturforsch.*, **14** b, 4-8.
4. DRAWERT H. et MIX M., 1961a. Licht und Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. V. Über die Variabilität der Chloroplastenstruktur bei *Micrasterias rotata*. *Planta*, **56**, 648-665.
5. DRAWERT H. et MIX M., 1961b. Licht und Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. VI. Der Einfluss von antibiotica auf die chloroplastenstruktur bei *Micrasteria rotata*. *Planta*, **57**, 51-70.
6. GIBBS S.P., 1962. The ultrastructure of the pyrenoids of green algae. *J. Ultrastructure Res.*, **7**, 262-272.
7. LEMBI C.A. et LANG N.J., 1965. Electron microscopy of *Carteria* and *Chlamydomonas*. *Am. J. of Bot.*, **52**, 464-477.

8. MANTON I., 1964. Observations on the fine structure of the zoospore and young germling of *Stigeoclonium*. *J. Exp. Botany*, **15**, 399-411.
9. MANTON I., 1966. Some possibly significant structural relations between chloroplasts and other cell components. In : *Biochemistry of chloroplasts*, I, 23-37. Goodwin ed., Academic Press.
10. PARK R.B., 1966. Chloroplast structure. In : *The Chlorophylls*, Academic Press, 283-311.
11. PUISEUX-DAO S. et LEVAIN N., 1963. Étude cytologique d'un *Mougeotia* (Conjugatophycées). *J. Microscopie*, **2**, 461-484.
12. PUISEUX-DAO S., 1964. Action de la ribonucléase sur des cellules vivantes de *Mougeotia* sp. (Conjugatophycées, Chlorophycées). I. Structure cellulaire du *Mougeotia* placé dans un milieu de culture contenant de la ribonucléase. *J. Microscopie*, **3**, 207-214.
13. REYNOLDS E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208-212.
14. STARR R.C., 1964. The culture collection of algae at Indiana University. *Amer. Jour. Bot.*, **51**, 1013-1044.
15. STRAIN H.H., 1951. The pigments of algae. In : *Manual of Phycology*, G.M. Smith ed., Chronica botanica, Waltham, Mass., 243-262.
16. VAN GANSEN P. et BOLOUKHERE-PRESBURG M., 1965. Ultrastructure de l'algue unicellulaire *Acetabularia mediterranea* LmX. *J. Microscopie*, **4**, 347-362.

Manuscrit reçu le 5 mai 1967.

Planche I

Fig. a. — Un jeune individu sphérique.

Le noyau (*N*) est volumineux. Dans le cytoplasme, on peut observer quelques mitochondries (*m*), un dictyosome (*d*) et des profils de réticulum endoplasmique (*re*). Le système vacuolaire (*v*) est encore peu développé. Les ramifications du plaste (*p*) forment une couche presque continue à la périphérie de l'algue. Elles sont riches en thylacoïdes allongés à peu près parallèlement à la surface. Le pyrénioïde (*py*) est traversé de quelques thylacoïdes (*t*) et entouré de grains d'amidon (*a*). Une zone du stroma (*s*) proche du pyrénioïde est relativement pauvre en lamelles. Le plaste contient également quelques globules d'aspect lipidique, sans doute caroténoïdes (*c*). La membrane pecto-cellulosique (*mc*) est peu épaisse; $\times 25\ 000$.

Fig. b. — Passage au stade siphonné.

Les vacuoles (*v*) sont de plus grande taille que dans l'exemple précédent. Dans le plaste, on observe deux pyrénioïdes (*py*). Dans cet individu, les pseudo-granums (*ps*) sont déjà, exceptionnellement à ce stade (voir texte), presque indépendants les uns des autres et formés de nombreuses « partitions ».

N, noyau; *mc*, membrane pecto-cellulosique; *g*, globule d'astaxanthine; $\times 20\ 000$.

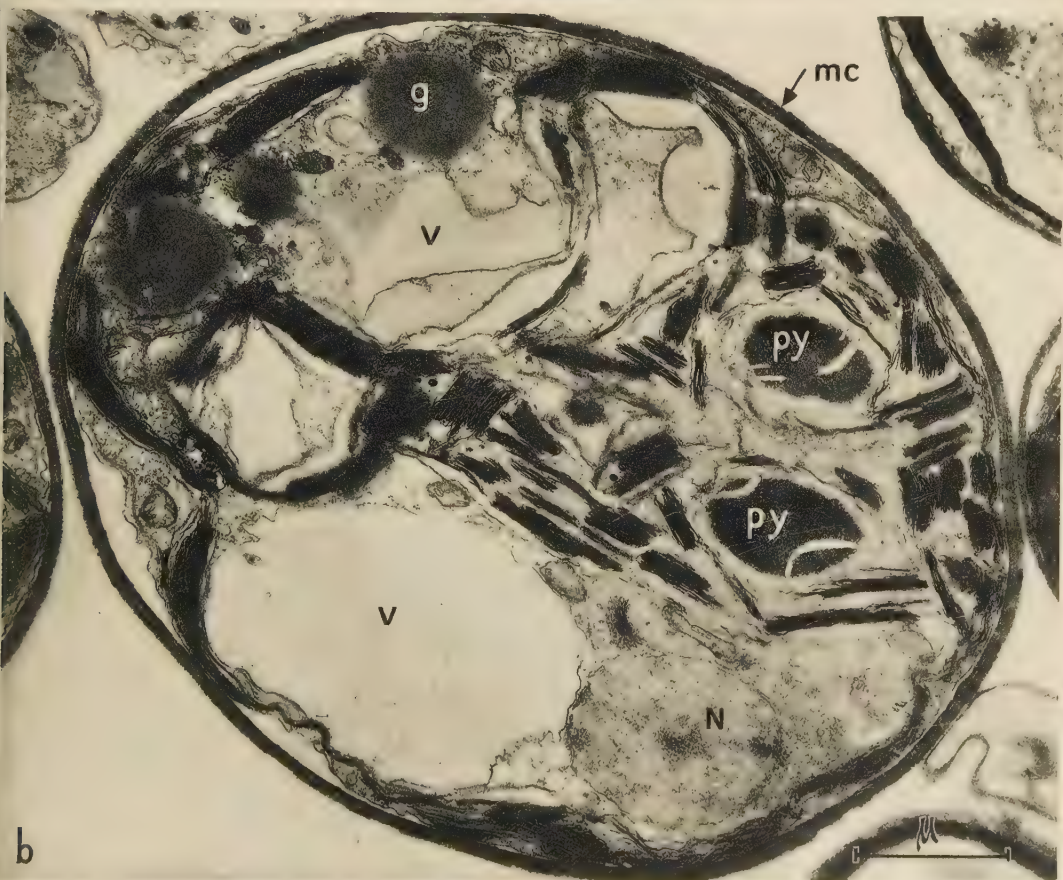
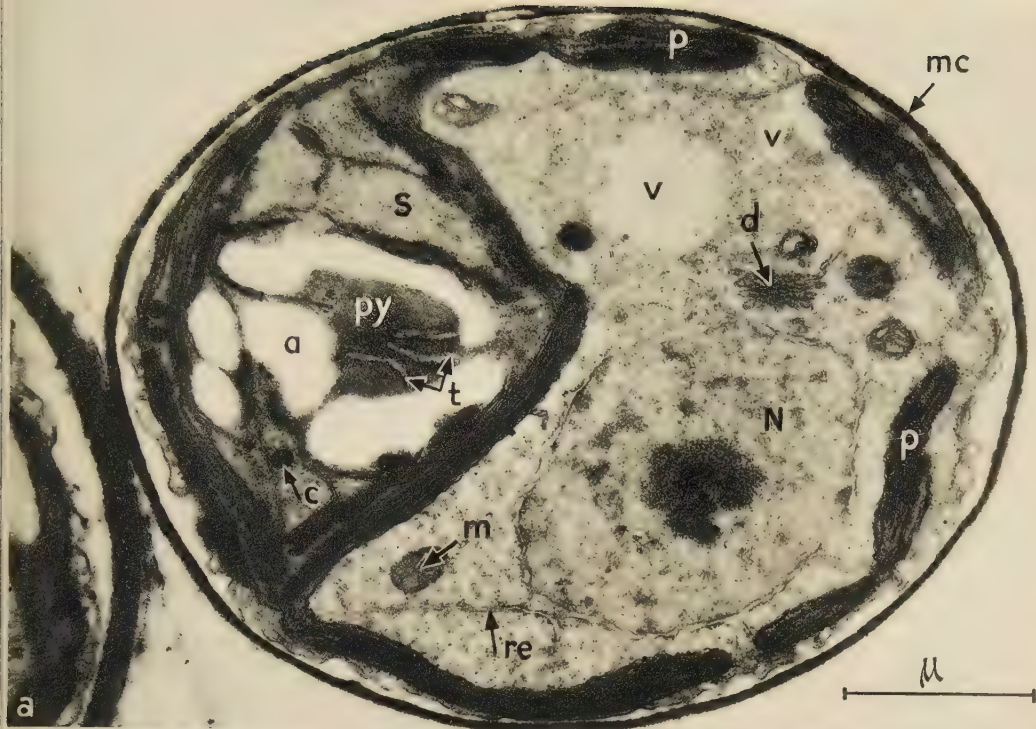


Planche II

Coupe transversale dans un individu siphonné.

Un système vacuolaire (*v*) très développé divise le cytoplasme en nombreux trabécules dans lesquels se ramifie le plaste. Entre la pellicule ectoplasmique (*me*), et la paroi de l'algue (*mc*), on observe souvent de nombreuses vésicules (*vs*).

n, noyau; *py*, pyrénôïde; $\times 7\ 500$.

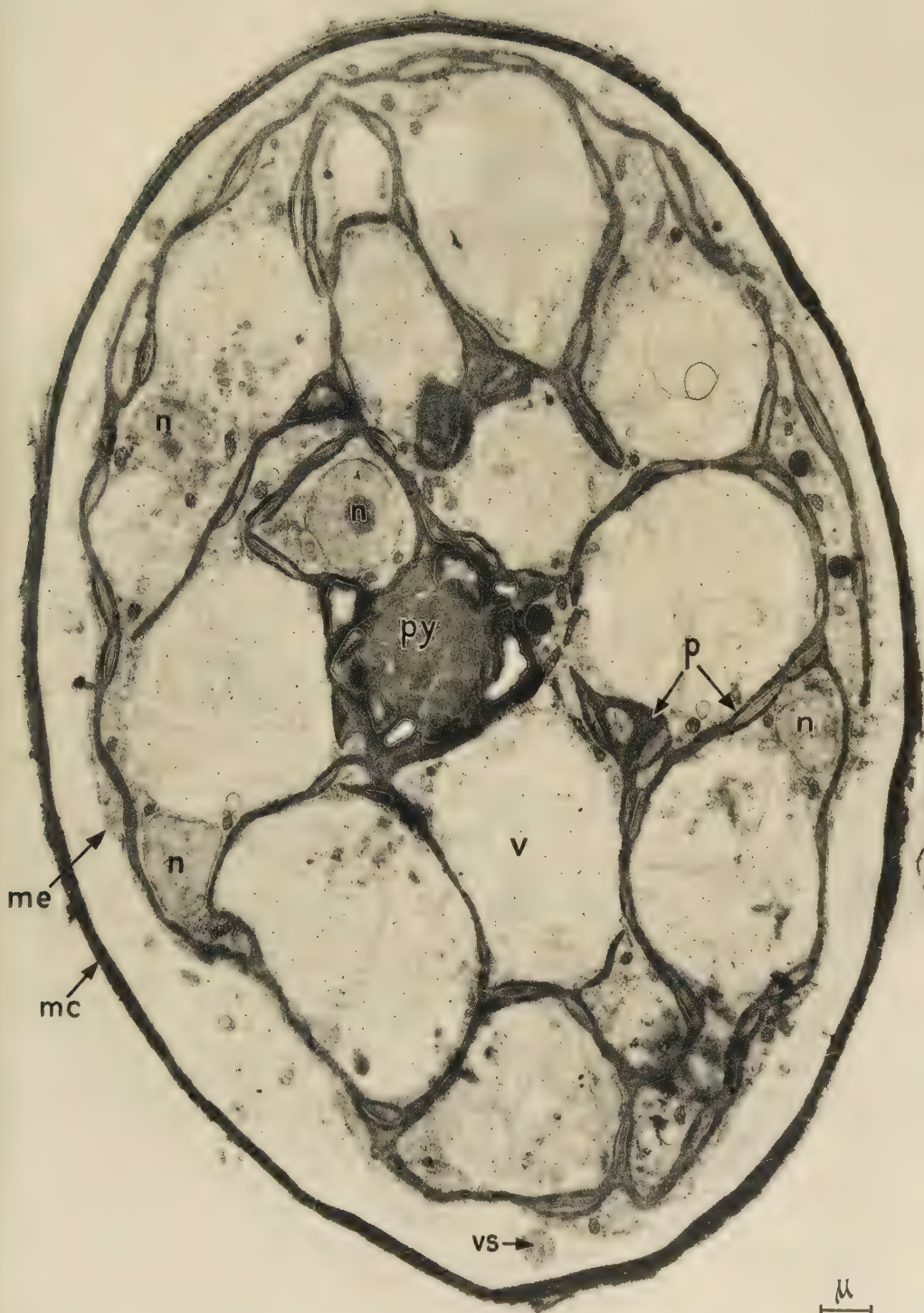


Planche III

Fig. a. — Un pyrénioïde dans le plaste d'un individu siphonné.

Le stroma finement granuleux du pyrénioïde (*s*) est entouré de volumineux grains d'amidon (*a*). Entre ces grains persistent de fins trabécules de stroma dans lesquels circulent des thylacoïdes (*t*). Certains pénètrent dans le pyrénioïde où leur lumière s'élargit et apparaît très claire (*t*₁). Dans la zone centrale du pyrénioïde on peut observer des pseudo-granums (*ps*) entourant une zone de stroma plus grossièrement granuleuse *s*₁. *v*, vacuole; *mc*, membrane pecto-cellulosique; × 30 000.

Fig. b. — Détail d'un pseudo-granum dans le plaste d'un individu siphonné.

Certaines des « partitions » (*flèche simple*) sont formées par l'accolement de deux thylacoïdes, d'autres (*flèche double*) par le repli interne d'un thylacoïde. *mc*, membrane pecto-cellulosique; *me*, membrane ectoplasmique; *mp*, membrane plastidale à double feuillet; *st*, stroma du plaste; × 135 000.

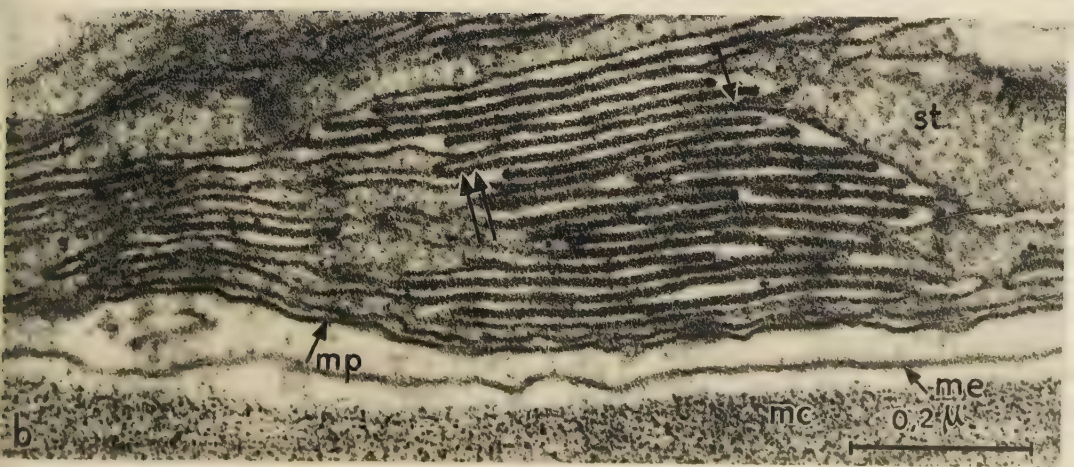
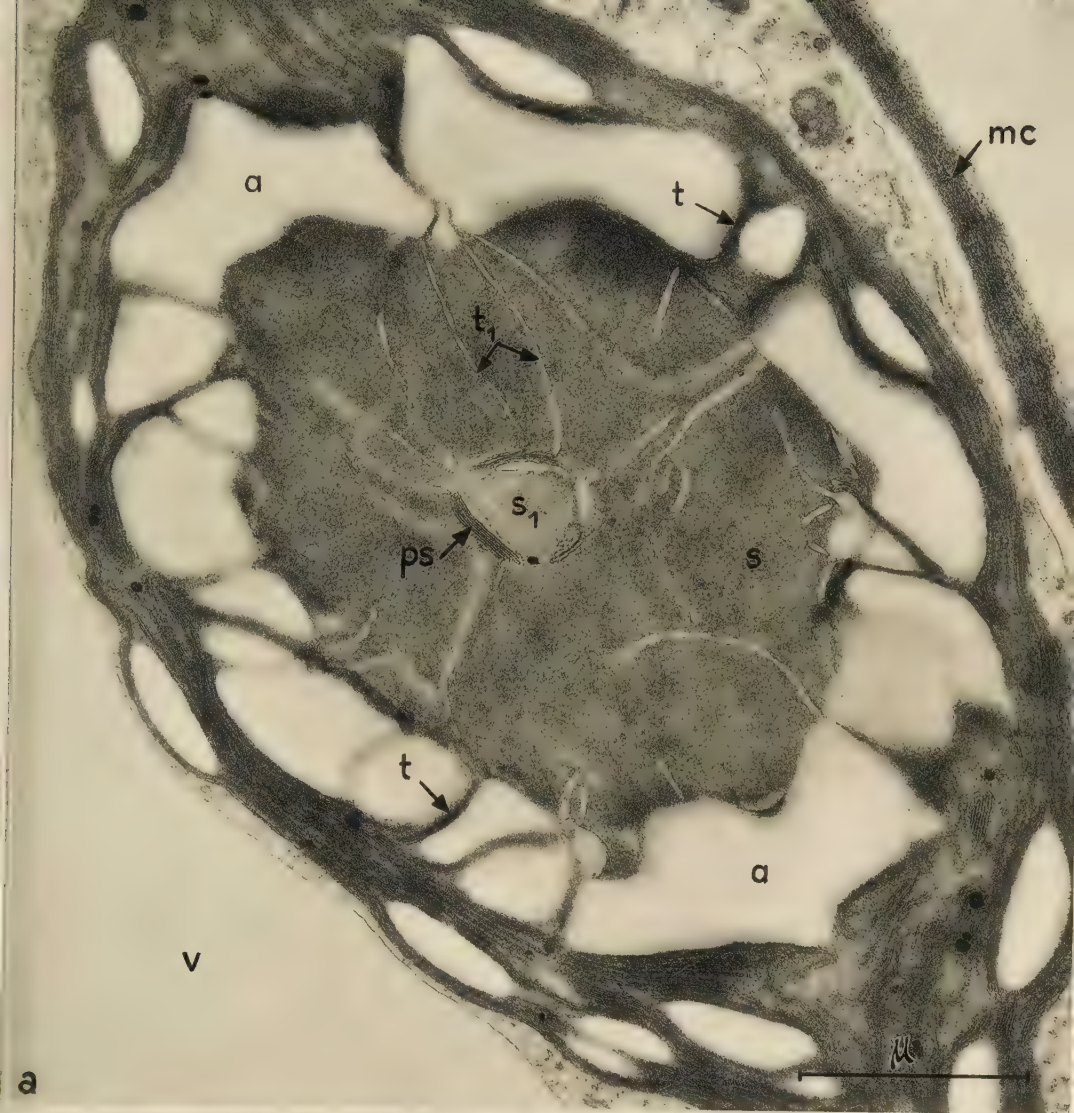


Planche IV

Fig. a. — Jeune individu siphonné : un territoire du plaste proche du pyrénôïde (*py*) contient des groupes de deux thylacoïdes (*t*), d'aspect très contourné, en relation avec des pseudo-granums (*ps*); $\times 35\ 000$.

Fig. b. — Un centriole en coupe transversale : on peut observer les neuf groupes de trois tubules caractéristiques (*tt*). *N*, noyau; *P*, plaste; $\times 75\ 000$.

Fig. c. — Deux centrioles (*c*) en coupe à peu près longitudinale au voisinage d'un noyau (*N*). La nature des masses sombres (*m*) n'a pu encore être précisée; $\times 75\ 000$.
Ces deux derniers clichés ont été obtenus à partir de coupes contrastées au permanganate de potassium, suivi de citrate de plomb.

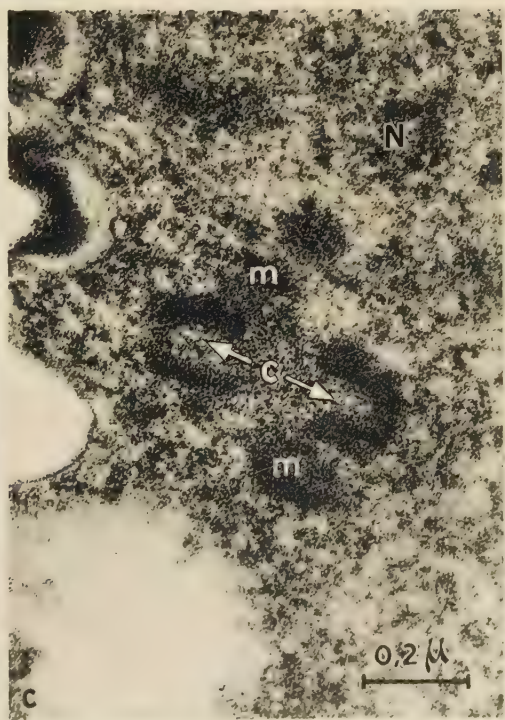
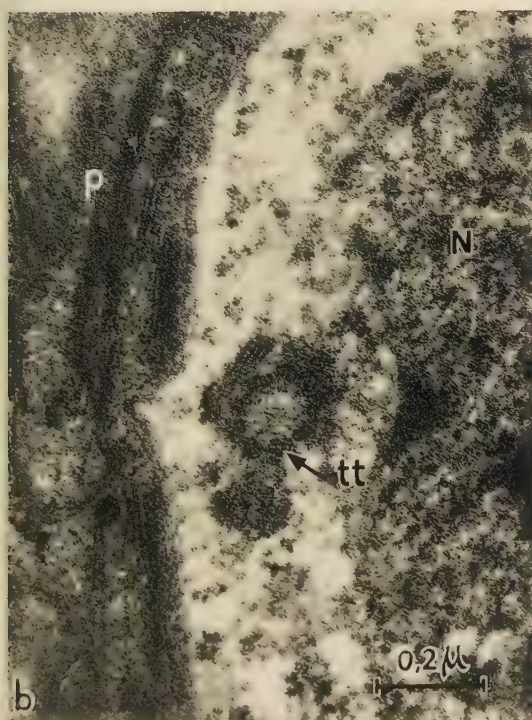
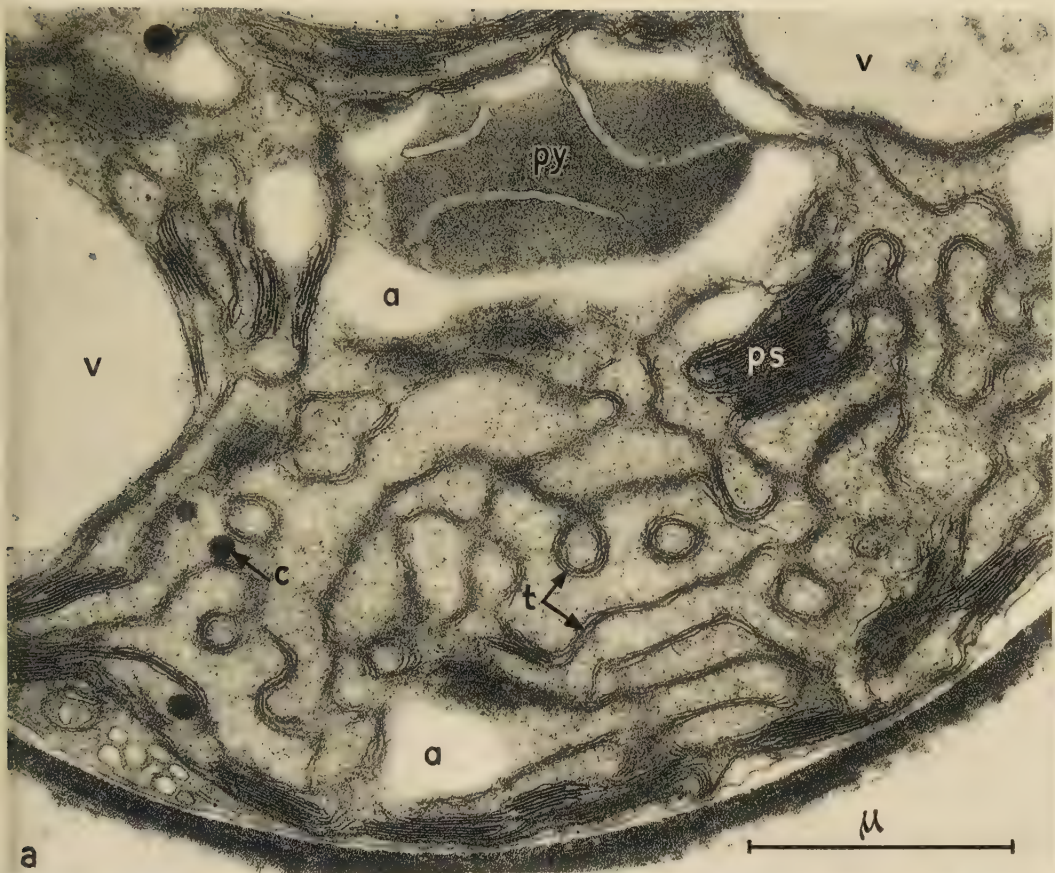


Planche V

Stade précoce de l'enkystement.

Le kyste contient un gros pyrénioïde central (*py*) d'où divergent de nombreuses ramifications plastidales (*p*). Le système vacuolaire est réduit à de nombreuses petites vacuoles (*v*) dont certaines présentent un contenu dense. Les globules d'astaxanthine (*g*) sont encore peu abondants. La membrane pecto-cellulosique (*mc*) est en cours d'épaississement; $\times 15\ 000$.



Planche VI

Deux kystes dans une culture en cours de rougissement.

A ce stade, la paroi pecto-cellulosique (*mc*) est déjà considérablement épaissie. Le plaste (*p*) et son pyrénoloïde (*py*) sont bien visibles. Les globules de pigment (*g*) sont déjà très abondants. Certains (*g*₁) sont rejetés tout à fait à la périphérie de la cellule. Leur taille est assez variable. Le kyste de la *Fig. a* contient un assez faible nombre de grains de pigments de grand diamètre. Celui de la *Fig. b*, une grande quantité de petits grains.

n, noyau; *a*, amidon; *Fig. a*, $\times 13\ 000$; *Fig. b*, $\times 16\ 000$.

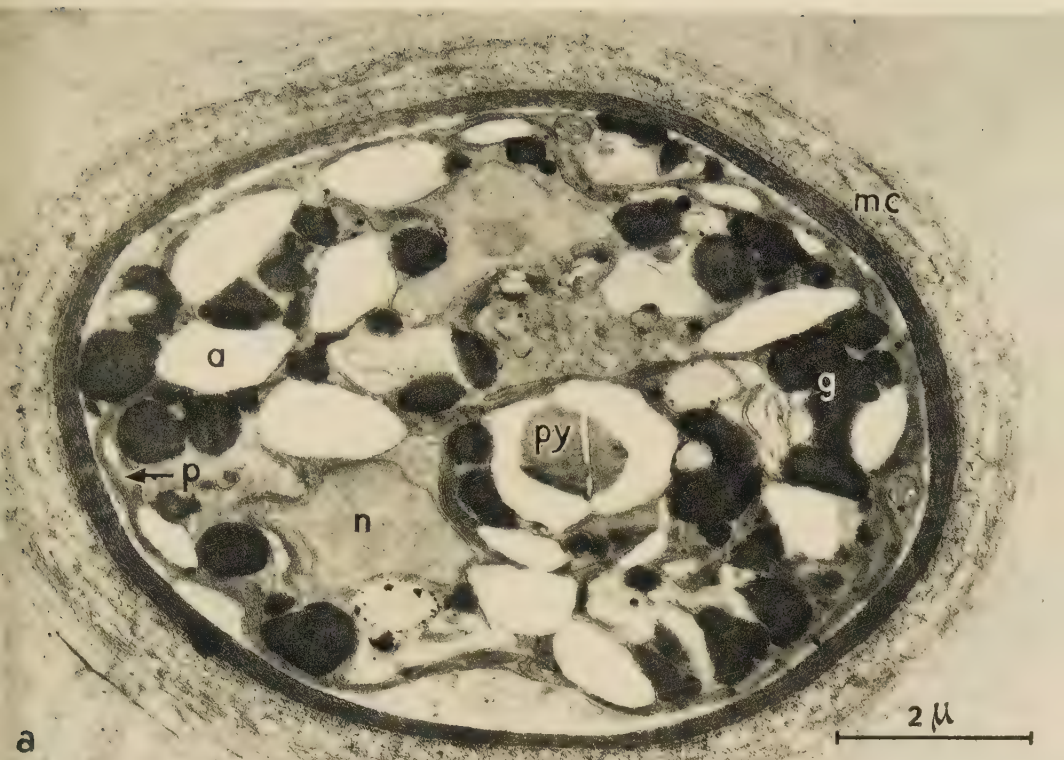


Planche VII

Détail d'un kyste orangé. Le plaste est extrêmement ramifié et son trajet dans la cellule est difficile à suivre. Dans cet individu, les pseudo-granums (*ps*) apparaissent à peu près indépendants les uns des autres.

Le pigment caroténoïde est réparti en nombreuses petites plages (*g*). Certaines d'entre elles (*g*₁) sont allongées le long des ramifications du plaste.

N, noyau; *v*, vacuoles à contenu dense; *re*, réticulum endoplasmique; *me*, membrane ectoplasmique; *mc*, membrane pecto-cellulosique; × 40 000.

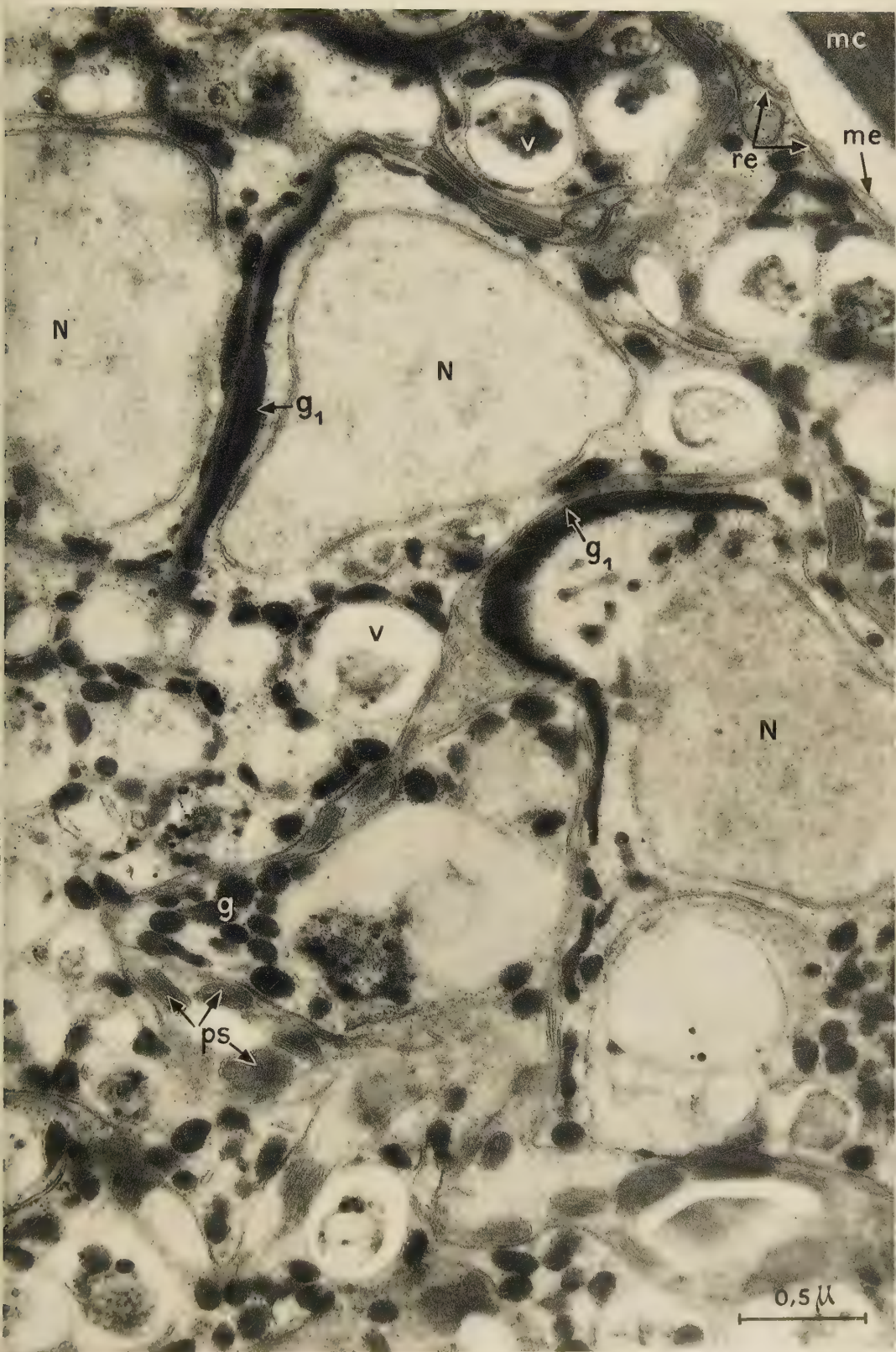


Planche VIII. — Détails du plaste dans des kystes en cours de rougissement.

Fig. a. — Deux sections du plaste montrant des pseudo-granums (*ps*) contenant de très nombreuses « partitions ».

v, vacuoles à contenu dense; *g*, globules de caroténoïde; *a*, amidon; $\times 60\ 000$.

Fig. b. — Deux ramifications très étroites du plaste. En certains endroits (*p*) leurs profils sont réduits aux deux membranes plastidales séparées par une peu épaisse couche de stroma. En d'autres, on peut observer des pseudo-granums (*ps*). Dans une autre zone du plaste, plus élargie (*P*), on peut voir deux grains d'amidon (*a*) et des thylacoïdes (*t*) encore assez allongés; $\times 60\ 000$.

Fig. c. — Dans certains cas, ces sections très étroites (*p*) sont groupées en formations concentriques encourant une zone de nécrose (*Nc*). Les zones extraplastidales contiennent des globules de caroténoïde (*g*); $\times 40\ 000$.

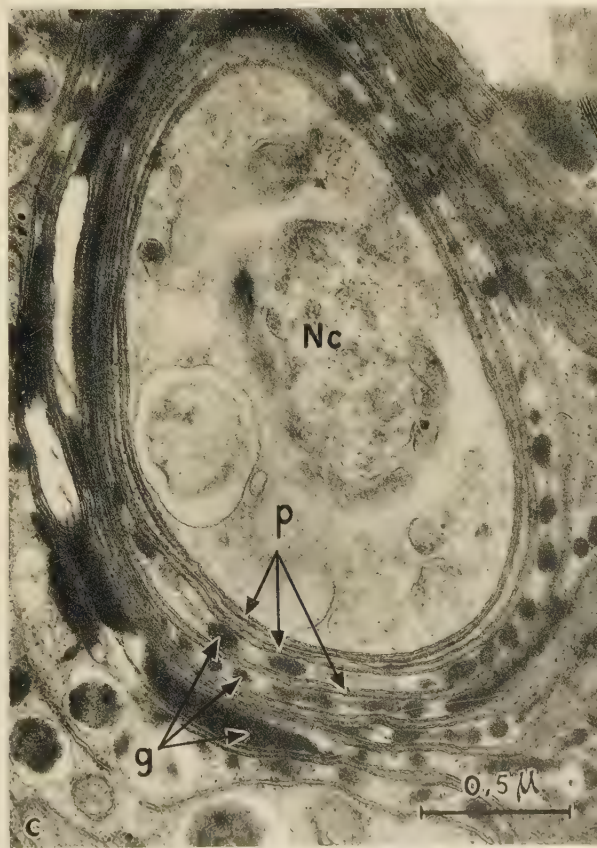
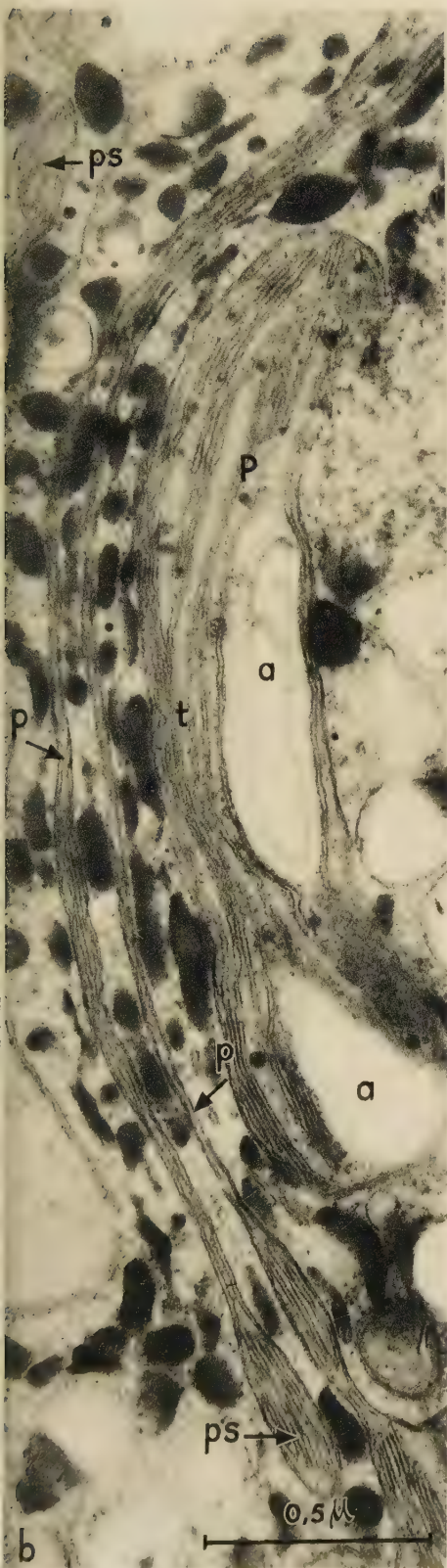


Planche IX

Fig. a. — Un kyste rouge. Sa paroi (*mc*) est très épaisse. La plus grande partie du cytoplasme est occupée par de gros amas de pigment (*g*). Toutefois, on reconnaît encore très bien les noyaux (*n*), et la partie centrale du plaste (*p*) avec son pyrénioïde (*py*) et des thylacoïdes. Les détails de structure des fines ramifications du plaste qui circulent entre les globules de pigment et s'étalent à la périphérie du cytoplasme, sont peu visibles à ce grossissement mais leur emplacement est facile à repérer grâce aux grains d'amidon (*a*) qu'elles contiennent; $\times 15\ 000$.

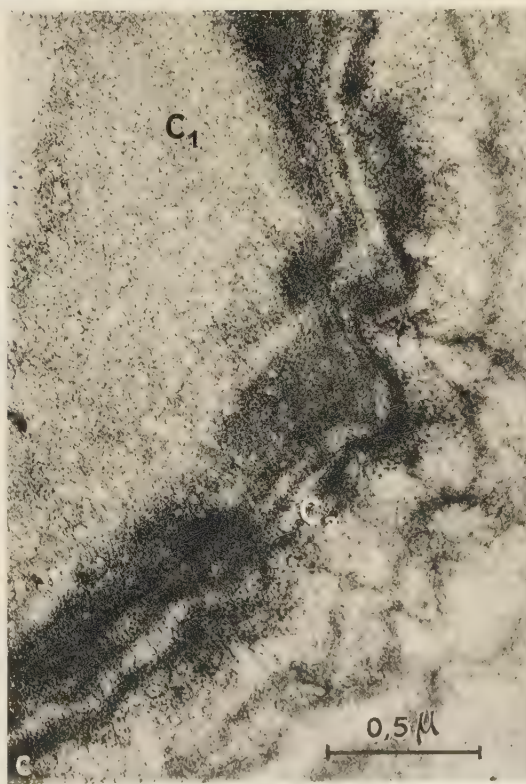
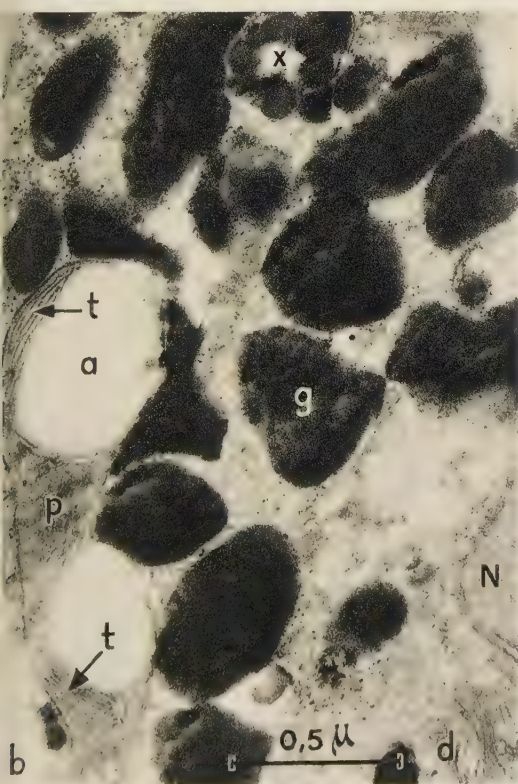
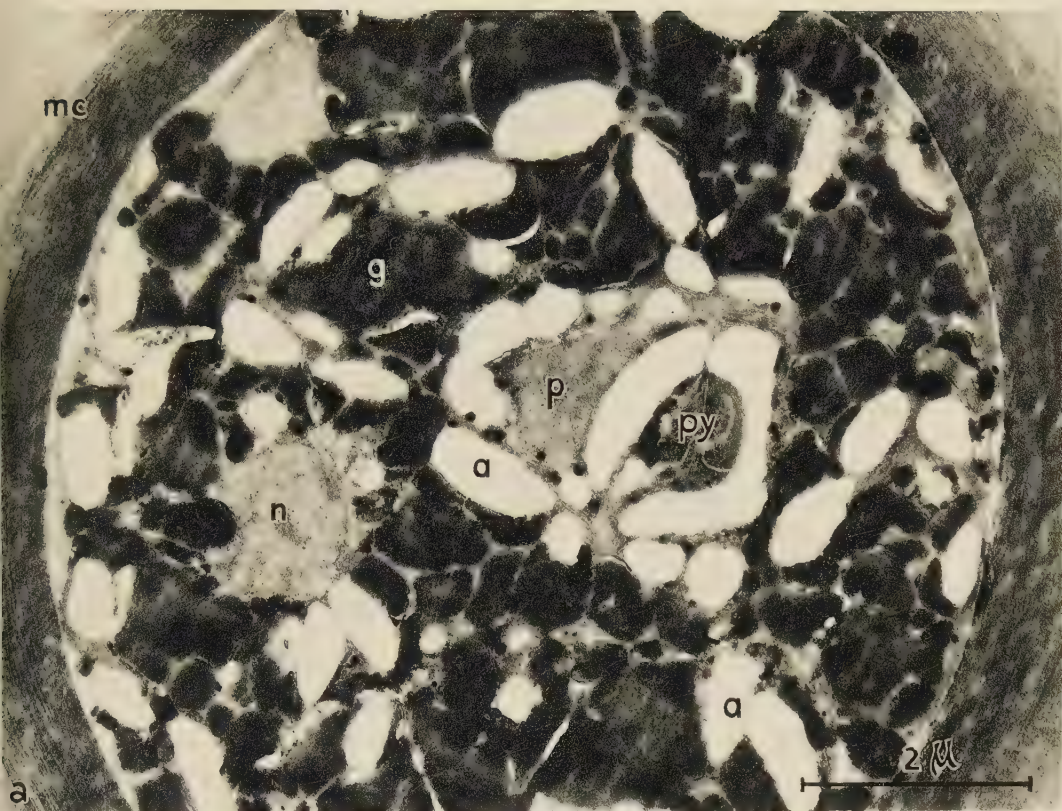
Fig. b. — Un détail dans un kyste rouge.

Les grains de pigment (*g*) sont très abondants, mais le plaste (*P*) contient encore des thylacoïdes (*t*) et de l'amidon (*a*). En *x*, on observe des globules denses à l'intérieur d'une sorte de vésicule. Ce type d'inclusion est relativement fréquent dans les kystes. Sa nature n'a pas pu être précisée pour le moment.

N, noyau; *d*, dictyosome; $\times 45\ 000$.

Fig. c. — Coupe très tangentielle dans la membrane d'un kyste.

La couche la plus interne, (*C*₁), vue presque de face, apparaît percée de nombreux petits pores. La partie plus externe, (*C*₂) est constituée d'une série de couches denses ou claires. Les plus externes semblent en cours de désorganisation; $\times 40\ 000$.



ÉVOLUTION DE L'ULTRASTRUCTURE ET DE L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE DE L'ALGUE VERTE *PROTOSIPHON BOTRYOIDES* AU COURS DU REVERDISSEMENT QUI SUIT LA LEVÉE DE CARENCE AZOTÉE

Claire BERKALOFF

Laboratoire de Botanique et Cytophysiologie Végétale de l'Ecole Normale Supérieure, E.R.A. du C.N.R.S. n° 179, 24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

INTRODUCTION

L'algue verte *Protosiphon botryoïdes*, algue des sols humides, peut être cultivée au laboratoire, aussi bien sur milieu gélosé que sur milieu liquide. Le devenir des individus formés est assez variable suivant les conditions de milieu. Bold (1933) a étudié en détail les différents types de développement possibles.

Dans un précédent article (Berkaloff, 1967), nous avons décrit les modifications ultrastructurales subies par l'algue au cours du dessèchement progressif d'une culture gélosée. Ces modifications s'accompagnent d'une abondante synthèse de pigments caroténoïdes dit « secondaires » (Kleinig et Czygan, 1969) qui s'accumulent dans le cytoplasme sous forme de gros globules. La culture devient progressivement rouge orangé.

Ce changement de pigmentation peut se produire également, comme chez d'autres algues (Dersch, 1960), sous l'action de facteurs autres que la dessiccation, en particulier par carence de certains éléments nutritifs. C'est ainsi qu'en cultivant le *Protosiphon botryoïdes* sur milieu carencé en azote, on observe, même en milieu liquide, un rougissement relativement rapide de la culture (Kleinig et Czygan, 1969).

Dans ces conditions (milieu liquide carencé en sels d'azote), les modifications ultrastructurales subies au cours du rougissement sont assez semblables à celles obtenues sur milieu gélosé normal. Nous indiquerons ci-dessous les différences observées.

D'autre part, l'introduction de sels d'azote (nitrates ou sels ammoniacaux) ou même d'urée dans une culture de ce type entraîne, au bout

* Cet article constitue la deuxième partie de l'article principal d'une thèse de Doctorat d'Etat de Sciences Naturelles, soutenue le 30 juin 1975 à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.

de quelques jours, le reverdissement complet de la culture, sans multiplication cellulaire (Dersch, 1960, sur d'autres espèces). On assiste en même temps à un certain nombre de remaniements structuraux que nous allons décrire.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

a. Culture

La souche utilisée, *Protosiphon botryoïdes* (Kütz) Klebs (99), provient de la collection d'algues de l'Université d'Indiana.

Les algues sont cultivées en erlenmeyer, sur milieu de Bristol (Berkaloff, 1967) enrichi en oligo-éléments et appauvri en sels d'azote (0,025 g de NaNO_3 par litre, c'est-à-dire le dixième de la concentration utilisée pour les cultures normales). La température est voisine de 18 °C.

Les cultures sont soumises à un rythme journalier de 12 heures d'éclairement pour 12 heures d'obscurité. L'éclairement est de l'ordre de 10 000 ergs/cm²/s fourni par des tubes fluorescents blancs.

Après rougissement complet de la culture, c'est-à-dire après environ trois semaines, des sels d'azote sont ajoutés au milieu, de façon à ramener la concentration à celle d'une culture normale.

b. Fixation et inclusion

Les algues sont fixées par le glutaraldéhyde postomié. Les bains successifs sont les suivants :

- glutaraldéhyde à 1 à 2 % dans un tampon cacodylate à pH 7,4 : 30 minutes à 2 heures ;
- tampon cacodylate : 2 à 20 heures ;
- tétroxyde d'osmium à 1 % dans du tampon au véronal à pH 7,4 : 1 heure.

Les échantillons sont ensuite déshydratés et inclus dans l'araldite. Les coupes, effectuées sur un microtome Sorvall, sont contrastées par l'acétate d'uranyl, suivi de citrate de plomb, puis observées sur un microscope Philips EMU 300.

c. Mesure des rapports Chla/Chlb

Les algues sont broyées dans un mortier en présence de sable, d'azote liquide et d'un mélange acétone/méthanol 1/1.

Dans le cas des algues enkystées rouges, cette technique est insuffisante pour extraire les pigments : il faut alors au préalable les soumettre à l'action d'une presse de French à des pressions élevées (de l'ordre de 1 600 bars).

L'extrait obtenu est repris soit par l'acétone à 80 % et les quantités de chlorophylles a et b calculées d'après les formules de MacKinney (1941), soit par l'éthanol. Dans le cas des algues au stade rouge, l'extrait pigmentaire est en effet très difficilement soluble dans l'acétone 80 %. Les quantités de chlorophylles a et b sont alors calculées d'après les formules de Wintermans et De Mots (1965).

d. Mesure de la fluorescence fixe

Les spectres d'émission de fluorescence sont obtenus avec les algues entières. L'échantillon est déposé sur un filtre Millipore placé dans un vase Dewar, dont le fond est formé de deux faces parallèles non argentées. Lors des mesures à basse température, de l'azote liquide est versé dans le vase. Un faisceau de lumière sensiblement monochromatique, obtenu à l'aide de filtres interférentiels Balzers (maximum à 438 nm) à partir d'un arc à mercure

(HBO 200) est envoyé sur l'échantillon. Un guide optique (Sovis) recueille la lumière émise, qui est analysée par un monochromateur (Bausch-Lomb 250). Un photomultiplicateur Dumont 6913 permet de mesurer à l'aide d'un galvanomètre l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée. La concentration en chlorophylle de l'échantillon est toujours faible, de façon à éviter la réabsorption de fluorescence (Mohanty *et al.*, 1972). Dans la plupart de nos mesures, la densité optique est de 0,05 à 678 nm.

e. Mesure des activités photosynthétiques

Les algues sont placées en suspension dans le milieu de culture (la densité optique de la suspension à 678 nm étant comprise entre 0,10 et 0,40) et leur production d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode polarographique de Clark (Yellow Spring Instrument Co., modèle 5331), thermostatée à 20 °C.

Les algues sont illuminées par deux lampes quartz-iode dont les radiations infrarouges sont éliminées par des filtres Athermex (M.T.O.) et Corning 255.

L'activité du photosystème II est mesurée par la vitesse de photoréduction de la p-benzoquinone ajoutée au milieu à la dose de 0,9 mM pour 3 cc. La mesure est effectuée après 10 minutes d'incubation dans le noir (Trebst, 1972), (Gimmler, 1973).

RÉSULTATS

A. Modifications ultrastructurales

1. Modifications au cours du rougissement de la culture

Cultivé en milieu liquide, le *Protosiphon* n'atteint pas un aussi grand développement que sur milieu gélosé. Les individus n'atteignent jamais une grande taille et ne dépassent guère l'aspect chlorococcal. C'est directement à partir d'individus de ce type qu'a lieu dans ce cas la zoosporogénèse. Par ce procédé, le nombre d'individus présents dans la culture augmente régulièrement jusqu'au moment où certains éléments nutritifs s'épuisent dans le milieu. A ce moment-là, les divisions s'arrêtent et les individus présents évoluent peu à peu vers une forme de résistance, ils s'enkystent et acquièrent une pigmentation orangée. Observée à l'échelle ultrastructurale, cette évolution du stade vert au stade rouge n'est pas très différente de celle observée en milieu gélosé. Ici aussi le pourcentage de surface cellulaire occupée par le plaste sur les sections devient moins important, au profit d'une accumulation de globules cytoplasmiques dans lesquels se déposent les pigments caroténoïdes secondaires (Berkaloff, 1970).

Quelques différences importantes sont toutefois à noter, en particulier le fait que le plaste se ramifie beaucoup moins et se trouve en général en fin d'évolution cantonné à un pôle de la cellule, les globules pigmentés s'accumulant à l'autre pôle. Les autres organites cellulaires (noyaux, mitochondries, dictyosomes, etc.) sont alors disposés dans la zone équatoriale (Pl. I, fig. a).

A ce stade, les globules occupent souvent plus des trois quarts du volume cellulaire. Dans le plaste, le ou les pyrénoides sont toujours

présents, les thylakoides encore visibles, mais la grande abondance d'amidon rend l'analyse de leur disposition difficile.

La paroi de ces cellules s'épaissit beaucoup, mais moins qu'en milieu gélosé toutefois : on peut, en général, y distinguer plusieurs couches plus ou moins compactes.

L'ensemble de cette évolution demande plusieurs semaines, et parfois même plusieurs mois.

En milieu préalablement carencé en azote, le changement de coloration de la culture est beaucoup plus précoce. Au niveau ultrastructural, les modifications apparaissent plus vite aussi ; à part cela, elles sont du même type que celles que l'on observe dans la culture normale. L'ensemble de l'évolution de la culture s'effectue dans ce cas en environ trois semaines.

2. Modifications qui accompagnent le reverdissement d'une culture carencée après adjonction d'une substance azotée.

Après l'addition au milieu de sels azotés, il s'écoule un laps de temps d'environ quarante-huit heures avant que l'on puisse observer une réponse au niveau des structures cytologiques. Au troisième jour après l'adjonction des sels azotés (Pl. I, fig. a), les globules sont toujours intacts, l'amidon abondant. La première modification visible consiste en l'apparition de petites vacuoles sensiblement sphériques (Pl. I, fig. a, v), surtout abondantes à la face interne du plaste, et contenant des inclusions denses de forme irrégulière et de nature indéterminée. En même temps, le plaste émet des prolongements en forme de lames fenestrées semble-t-il ; on observe souvent de telles « langues » plastidiales à la périphérie du cytoplasme, immédiatement sous la membrane cytoplasmique. D'autres s'insinuent entre les divers organites cellulaires puis entre les globules (Pl. I, fig. b). Ces digitations plastidiales prennent un grand développement au cours des jours suivants (Pl. III, fig. a et Pl. IV, fig. a). Elles contiennent de nombreux thylakoides allongés (Pl. V, fig. b). En même temps, la zone cytoplasmique médiane apparaît comme le siège d'une activité métabolique intense (Pl. II, fig. a) : les vacuoles à inclusions denses sont nombreuses ainsi que les mitochondries, le réticulum endoplasmique abondant par endroits. Enfin, le nombre de noyaux lui-même paraît augmenter.

Aux environs du cinquième jour, des aspects de digestion des globules apparaissent dans beaucoup de cellules (Pl. II, fig. b), les globules prennent souvent un aspect annulaire ou en coupe ; ils semblent en quelque sorte attaqués par l'intérieur, la partie la plus périphérique du globule disparaissant en dernier (Pl. III, fig. b et Pl. IV, fig. b).

Le volume cellulaire occupé par ces formations globulaires dans la cellule diminue progressivement. Au huitième ou dixième jour (Pl. III, fig. a), il n'en reste plus en général que quelques-uns à un pôle cellulaire. Les vacuoles chargées d'inclusion disparaissent aussi peu à peu ou tout au moins deviennent moins abondantes. Au douzième jour après l'adjonction des substances azotées (Pl. IV, fig. a), pratiquement tous les individus vivants de la culture présentent une constitution cytologique ana-

logue à celle des individus verts normaux, à l'exception toutefois de la paroi.

Les kystes rouges de la culture carencée présentaient en effet une paroi épaisse formée de nombreuses couches de fibrilles empilées concentriquement de façon assez dense. Cette paroi existe toujours à la fin du reverdissement, mais son aspect s'est sensiblement modifié (Pl. V, fig. a) : les différentes couches sont associées plus lâchement entre elles, l'ensemble apparaît « gonflé ».

Si on laisse évoluer cette culture assez longtemps, elle rougit à nouveau après épuisement des éléments nutritifs. Des individus prélevés sur une culture ainsi reverdie et placés en milieu frais donnent naissance à des individus flagellés par un processus analogue à celui des individus verts normaux.

B. Variations du spectre d'émission de fluorescence et du rapport $\frac{\text{Chla}}{\text{Chlb}}$

Le spectre d'émission de fluorescence des cellules de *Protosiphon botryoïdes* présente trois pics à 685, 695 et 715 nm (Berkaloff et Jupin, 1974). Dans les cultures en croissance active, le pic à 715 nm est le plus haut. Au cours de l'enkystement, les rapports $\frac{F_{685}}{F_{715}}$ et $\frac{F_{695}}{F_{715}}$ (en notant FX = niveau d'émission de fluorescence à X nm) augmentent régulièrement, le pic à 715 nm étant pratiquement masqué en fin d'évolution (Figure 1). Après levée de la carence azotée, le spectre d'émission de fluorescence reprend rapidement les caractéristiques de celui des individus verts normaux.

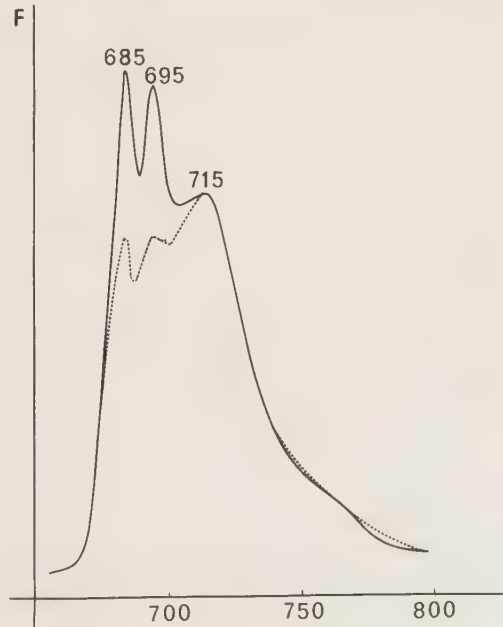


FIGURE 1. — Spectre d'émission de fluorescence à 77 °K d'une jeune culture verte (----) et d'une culture enkystée en milieu liquide en conditions de carence azotée (—).

Après l'addition des nitrates, le spectre reprend en 3 ou 4 jours les caractéristiques de celui de jeunes cultures vertes.

Cependant le rapport $\frac{\text{Chla}}{\text{Chlb}}$ varie peu en général. Il semble toutefois pouvoir augmenter légèrement au cours du reverdissement. Voici des exemples de valeurs obtenues au cours de trois expériences de reverdissement.

	RAPPORT Chla/Chlb		
	A	B	C
Culture rouge	2,28	2,31	2,37
Culture en cours de reverdissement	2,19	2,80	2,40
Culture reverdie	2,27	3,29	2,54

C. Activité photosynthétique

Pour un volume de culture donné, l'activité photosynthétique globale mesurée par la quantité d'oxygène dégagée par unité de temps augmente considérablement : elle évolue parallèlement à la synthèse de chlorophylle dans les algues : en effet, les valeurs obtenues apparaissent sensiblement constantes si elles sont exprimées en fonction de la chlorophylle présente.

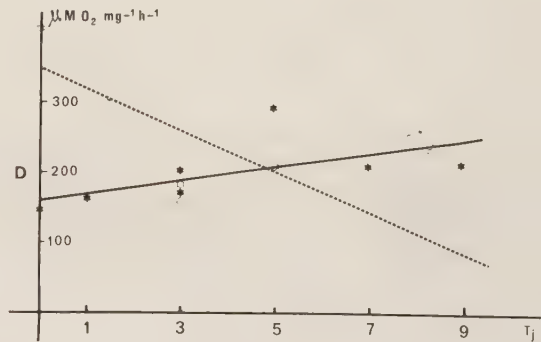
Rapportée au même paramètre, la vitesse de photoréduction de la p-benzoquinone à la lumière, considérée comme représentative de l'activité du photosystème II, diminue notablement au cours du reverdissement (Figure 2).

FIGURE 2. — Evolution de l'activité photosynthétique globale (★, —) et du dégagement d'oxygène en présence de p-benzoquinone (☆, ----) dans une culture en cours de reverdissement. L'activité est exprimée en μM d'oxygène libérées par mg de chlorophylle et par heure, le temps (T_j) en jours après l'addition des nitrates.

★ ☆ valeurs expérimentales obtenues.

— ---- droites de régression correspondantes.

Au temps T_0 , la culture contient $0,4 \mu\text{g}$ de chlorophylle par cm^3 . Au temps $T=2$ jours, elle en contient $1,3 \mu\text{g}$ et au temps $T=5$ jours, $2,5 \mu\text{g}$.



DISCUSSION

A. Evolution du plaste et des complexes chlorophylliens

Dans une précédente publication (Berkaloff, 1967), nous avons décrit les modifications subies par le plaste au cours de l'enkystement et noté en particulier la disparition progressive des lamelles intergranaires et le développement des structures pseudo-granaires.

Au cours du reverdissement, une évolution inverse se produit : l'augmentation de volume du plaste est accompagnée par la réapparition de thylakoïdes allongés, du type de ceux observés dans les plastes jeunes. Les spectres d'émission de fluorescence se modifient parallèlement : au cours du rougissement, les pics à 685 et 695 nm deviennent peu à peu prépondérants ; au moment du reverdissement, le pic à 715 nm reprend son importance première.

Dans le cas de la *Chlorelle*, dont le spectre d'émission de fluorescence est assez semblable à celui du *Protosiphon*, Cho et Govindjee (1970) admettent que le pic F 725 correspond aux holochromes liés au photosystème I, les autres pics étant liés à la fois aux photosystèmes I et II. Il apparaît donc que chez *Protosiphon*, comme dans d'autres organismes (Woo *et al.*, 1970), le niveau de fluorescence relatif des holochromes du photosystème I décroît lorsque le rapport membranes granaires/membranes intergranaires augmente.

Par contre, le rapport $\frac{\text{Chla}}{\text{Chlb}}$ ne varie pas de façon très importante, ni au cours de l'enkystement ni au cours du reverdissement ; ce qui, cette fois, s'oppose aux observations effectuées par Woo *et al.* (1970).

Si nous nous rapportons, maintenant, aux mesures de l'activité photosynthétique, nous constatons que, si la teneur en chlorophylle de la culture s'accroît, l'activité photosynthétique totale rapportée à la chlorophylle reste sensiblement constante. Par contre, l'activité relative du photosystème II (rapportée à la chlorophylle) diminue : la synthèse pigmentaire et protéique paraît donc porter préférentiellement sur les complexes du photosystème I ; observation qui paraît confirmée par l'augmentation du rapport $F\ 715/F\ 695 + F\ 685$ au cours du reverdissement.

B. Rôle et nature des globules

Au cours de l'évolution d'une culture de *Protosiphon* en conditions de carence azotée, il se produit en quelque sorte une déviation du métabolisme cellulaire normal. Les cellules utilisent les éléments nutritifs qui leur sont fournis, ainsi que l'énergie lumineuse captée par leurs plastes, à la synthèse de substances non azotées : amidon dans les plastes et lipides (Berkaloff et Kader, 1975) dans les globules extraplastidaux. Ces formations occupent un pourcentage de volume cellulaire de plus en plus grand, aux dépens de structures métaboliquement actives (en particulier les membranes plastidiales, dont le turn-over protéique ne peut plus être assuré). A priori, ces substances pourraient apparaître comme

des déchets qui encombrant la cellule au fur et à mesure de son vieillissement. En fait, l'évolution observée au cours du reverdissement, après adjonction de sels azotés, montre qu'il s'agit, au moins pour une part importante d'entre elles, de réserves : c'est en tout cas ce que suggère la disparition progressive des globules et les aspects de digestion que nous avons pu observer.

Ce phénomène rappelle, par sa nature, l'utilisation des réserves lipidiques au cours de la germination de certaines graines oléagineuses (Gruber *et al.*, 1970 ; Vigil, 1970 ; Gerhard et Beevers, 1970). Chez ces dernières, de nombreux travaux ont mis en évidence, à côté des globules gras, des organites à membrane simple appelés glyoxysomes et qui jouent un rôle actif dans la réutilisation par l'organisme des réserves lipidiques (pour l'abondante bibliographie concernant ce problème, nous renvoyons aux articles de mise au point de Tolbert (1971) et Richardson (1974)). Dans le cas du *Protosiphon* en reverdissement, nous n'observons généralement qu'un type d'organites, les globules que nous avons décrits. Dans de rares cas seulement, nous avons observé dans les algues en cours de reverdissement quelques structures distinctes des globules et qui pourraient être assimilées à des glyoxysomes (Pl. I, fig. c).

En fait, si les globules présentent un aspect morphologique assez proche des sphérosomes (Yatsu *et al.*, 1971), ils offrent également dans certains cas et en particulier, nous le verrons, après isolement, des ressemblances frappantes avec les glyoxysomes décrits par certains auteurs ; certains, en particulier, sont creusés de cavités sphériques identiques à celles observées sur des glyoxysomes de Ricin par Breidenbach *et al.* (1967).

La recherche de la catalase par les réactions classiques à la diaminobenzidine n'a révélé aucun précipité au niveau des globules qui ne semblent donc pas contenir une quantité appréciable de catalase.

Ce résultat est analogue à celui de Giraud et Czaninski (1971) ainsi qu'à ceux de Gerhardt et Berger (1971) qui, chez deux autres algues vertes, n'observent aucun précipité dans les « microbodies » à pH 9. Ce résultat négatif est noté également par plusieurs auteurs (Graves *et al.*, 1971), même dans le cas où la présence de catalase dans ces organites est prouvée par des techniques biochimiques (Codd *et al.*, 1973 ; Gerhardt et Berger, 1971). Certains auteurs pourtant obtiennent une réaction positive (Tourte, 1971).

Dans ces conditions, l'ambiguïté concernant les organites que nous étudions reste entière. Le dosage de l'isocitrate lyase ou de la malate synthétase dans les globules pourrait permettre de préciser leur nature. Malheureusement, l'isolement d'une fraction globulaire (Berkaloff, 1970) devient très difficile au cours du reverdissement. Quoi qu'il en soit, la mobilisation des réserves globulaires permet un rajeunissement rapide des cellules, avec reprise d'une forte activité métabolique et synthèse de nouvelles structures.

L'ensemble du processus décrit montre que l'évolution cellulaire

subie par le *Protosiphon botryoïdes* au cours du rougissement est entièrement réversible. En particulier, le plaste s'avère susceptible de réacquérir rapidement les caractéristiques ultrastructurales et fonctionnelles du plaste jeune. Un phénomène analogue a été décrit chez *Chlorella* par Guérin-Dumartrait *et al.* (1970), également après levée d'une carence azotée. Le reverdissement du *Protosiphon* peut également être comparé à celui décrit pour des fruits de Végétaux supérieurs, en particulier dans certaines variétés d'Oranges, sous l'action de substances de croissance (Thomson *et al.*, 1967) ou spontanément chez *Cucurbita* (Devide et Ljubescic, 1974) : dans les plastes de ces fruits, on observe une disparition progressive des plastoglobules, accompagnée d'une synthèse de thylakoïdes. Malgré la nature extraplastidale des globules du *Protosiphon*, les deux phénomènes apparaissent très semblables.

Une étude complète de la composition des globules pigmentés est en cours, elle devrait permettre de préciser les phénomènes qui interviennent dans l'élaboration ou l'utilisation de leurs composants.

RÉSUMÉ

L'algue verte *Protosiphon botryoïdes* (Kütz) Klebs cultivée sur milieu liquide rougit et s'enkyste au fur et à mesure que le milieu s'épuise en éléments nutritifs. Ce rougissement est plus rapide sur milieu pauvre en azote que sur milieu normal. Au cours de cette évolution, le cytoplasme des algues se charge de globules lipidiques porteurs de caroténoïdes, le plaste est rejeté à un pôle cellulaire. Après levée de cette carence par adjonction de sels azotés, la culture reverdit en quelques jours sans division cellulaire : le plaste émet des digitations qui s'insinuent sous la membrane cytoplasmique et entre les globules. Ceux-ci présentent dans les jours qui suivent des figures d'invololution semblant correspondre à une digestion progressive de leur contenu. Au douzième jour après la levée de carence, ils ont pratiquement disparu. Le plaste occupe à nouveau l'essentiel du volume cellulaire, il est riche en thylakoïdes allongés.

Le spectre d'émission de fluorescence, dans lequel les pics à 685 nm et 695 nm étaient peu à peu devenus prépondérants au cours du rougissement, reprend rapidement au cours du reverdissement les caractéristiques observées chez les jeunes cultures vertes : le pic à 715 nm redevient le plus important. La synthèse rapide de chlorophylle au cours du reverdissement paraît porter préférentiellement sur les complexes du photosystème I.

SUMMARY

The green alga *Protosiphon botryoïdes* (Kütz) Klebs, when cultivated on liquid medium, turns progressively red and encysts as nutrients disappear. This happens more rapidly in a nitrogen deprived than in a normal medium. During this evolution, lipidic carotenoid globuli progressively fill the cytoplasm, confining the chloroplast to one side of the cell. After addition of nitrates, culture regreening takes place within ten days, without cellular

multiplication. The chloroplast forms finger-like processes which extend along the cytoplasmic membrane and between the carotenoid globuli. During the following days, these globuli seem to be progressively digested. Twelve days after nitrogen addition, they have almost entirely disappeared. The chloroplast occupies again the greatest part of the cell: it exhibits many large thylakoids.

Emission fluorescence spectra of *Protosiphon botryoides* possess three maxima, localized at 685, 695 and 715 nm. During encystment, 685 and 695 nm pikes increase greatly and become the highest. On regreening, there is a switch to the characteristics observed in young cultures: 715 nm maximum become again the most important. Rapid synthesis of chlorophyll occurring during regreening seems to concern preferentially photosystem I complexes.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERKALOFF C., 1967. Modifications ultrastructurales du plaste et de divers autres organites cellulaires au cours du développement et de l'enkystement du *Protosiphon botryoides* (Chlorophycées). *J. Microscopie*, **6**, 839-852.
2. BERKALOFF C., 1970. Essai d'isolement des globules pigmentés extra-plastidaux de l'algue *Protosiphon botryoides*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **271**, 1518-1521.
3. BERKALOFF C. et JUPIN H., 1974. Modifications du spectre d'émission de fluorescence et de l'ultrastructure du plaste de l'algue verte *Protosiphon botryoides* soumise à l'action de la streptomycine. *Protoplasma*, **80**, 41-55.
4. BERKALOFF C. et KADER J.C., 1975. Variations of the lipid composition during the formation of cysts in the green alga *Protosiphon botryoides*. *Phytochemistry*, **14**, 2353-2355.
5. BOLD H.C., 1933. The life history and cytology of *Protosiphon botryoides*. *Bul. Torrey Bot. Club*, **60**, 241-299.
6. BREIDENBACH R.W., KAHN A. et BEEVERS H., 1968. Characterization of glyoxysomes from castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, **43**, 705-13.
7. CHO F. et GOVINDJEE, 1970. Fluorescence spectra of *Chlorella* in the 295-77 °K range. *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 371-78.
8. CODD G.A., SCHMID G.H. et KOWALLIK W., 1973. Further enzymatic studies and electron microscopy of the microbodies of a mutant of *Chlorella vulgaris*. *Arch. f. Mikrob.*, **92**, 21-38.
9. DERSCH G., 1960. Mineralsalz-mangel und Secundärcarotenoïde in Grünalgen. *Flora*, **149**, 566-603.
10. DEVIDE Z. et LJUBESIC N., 1974. The reversion of chromoplasts to chloroplasts in pumpkin fruits. *Z. f. Pflanzenphysiologie*, **73**, 296-306.
11. GERHARDT B.P. et BEEVERS H., 1970. Developmental studies on glyoxysomes in *Ricinus* endosperm. *J. Cell Biol.*, **44**, 94-102.
12. GERHARDT B.P. et BERGER Ch., 1971. Microbodies und DAB Reaktion in den acetat Flagellaten *Polytomella caeca* und *Chlorogonium elongatum*. *Planta*, **100**, 155-166.

13. GIMMLER H., 1973. Correlations between phosphorylation and light-induced conformational changes of chloroplast in whole cells of the halophilic green alga *Dunaliella parva*. *Z. f. Pflanzenphysiologie*, **68**, 289-307.
14. GIRAUD G. et CZANINSKI Y., 1971. Localisation ultrastructurale d'activités oxydasiques chez le *Chlamydomonas reeihardi*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **273**, 2500-03.
15. GRAVES L.B., HANZELY L. et TRELEASE R.N., 1971. The occurence and fine structural characterization of microbodies in *Euglena gracilis*. *Protoplasma*, **72**, 141-152.
16. GRUBER P.J., TRELEASE R.N., BECKER W.M. et NEWCOMB E.H., 1970. A correlative ultrastructural and enzymatic study of cotyledonary microbodies following germination of fat-storing seeds. *Planta*, **93**, 269-288.
17. GUERIN-DUMARTRAIT E., MIHARA S. et MOYSE A., 1970. Composition de *Chlorella pyrenoidosa*, structure des cellules et de leurs lamelles chloroplastiques, en fonction de la carence en azote et de la levée de carence. *Can. J. Bot.*, **48**, 1147-1154.
18. KLEINIG H. et CZYGAN F. Ch., 1969. Lipids of *Protosiphon* (Chlorophyta). I. Carotenoids and caretenoid esters of five strains of *Protosiphon botryoides* (Kütz) Klebs. *Z. f. Naturforschung*, **24b**, 927-930.
19. MACKINNEY G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**, 315-322.
20. MOHANTY P., BRAUN B.Z., GOVINDJEE et THORNBERG J.P., 1972. Chlorophyll fluorescence characteristics of system I chlorophyll protein complex and system II particles at room and liquid nitrogen temperatures. *Plant and Cell Physiol.*, **13**, 81-89.
21. RICHARDSON M., 1974. Microbodies (glyoxysomes and peroxysomes) in plants. *Sci. Prog. Oxf.*, **61**, 41-61.
22. THOMSON W.W.L. et LEWIS L.N., 1967. The reversion of chromoplasts to chloroplasts in Valencia oranges. *Cytologia*, **32**, 117-127.
23. TOLBERT N.E., 1971. Microbodies - Peroxysomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, **22**, 45-74.
24. TOURTE M., 1971. Identification et rôle des vésicules de type « peroxy-some » chez *Micrasterias fimbriata*. *J. Microscopie*, **11**, 96.
25. TREBST A., 1972. Measurement of Hill reactions and photoreduction. In: *Methods in Enzymology*. Colowick S.P. and Kaplan N.O., eds., Academic Press, New York, vol. XXIV, 146-165.
26. VIGIL E.L., 1970. Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.*, **46**, 435-454.
27. WINTERMANS J.F.G.M. et DE MOTS A., 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their phaophytins in ethanol. *Biochem. Biophys. Acta*, **109**, 448-453.
28. WOO K.C., ANDERSON J.M., BOARDMAN N.K., DOWNTON W.J.S., OSMOND C.R. et THORNE S.W., 1970. Deficient photosystem II in agranal bundle sheat chloroplast of C4 plants. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **67**, 18-25.

29. YATSU L.Y., JACKS T.J. et HENSARLING T.P., 1971. Isolation of spherosomes (oleosomes) from onion, cabbage and cotton-seed tissues. *Plant. Physiol.*, **48**, 675-682.

Manuscrit reçu le 23 avril 1975.

Accepté pour publication le 24 septembre 1975.

Planche I

Fig. a. — Jusqu'au troisième jour après la levée de carence l'ultrastructure des algues reste celle des algues carencées rouges ; un pôle cellulaire est occupé par les globules (*G*), l'autre par le plaste (*P*) très riche en amidon (*a*) (*p*, pyrénolide). Dans la zone médiane se localisent les noyaux (*N*). Dans cet individu fixé au troisième jour, on observe toutefois quelques petites vacuoles à inclusions denses (*v*) et quelques digitations du plaste (*d*) qui s'insinuent dans la zone globulaire. Quelques globules sont creusés de cavités à contenu granuleux (*cg*) : peut-être s'agit-il d'un début de digestion ; $\times 15\ 000$.

Fig. b. — Au même stade, une coupe dans un plan perpendiculaire à celui du cliché précédent, dans la zone globulaire (*G*, globules), permet de mieux observer les digitations plastidiales (*d*) qui s'insinuent entre les globules ; (*m*), mitochondrie ; $\times 15\ 000$.

Fig. c. — Un détail des globules (*G*) dont la périphérie apparaît souvent plus claire que la partie centrale. En X, un organite hypothétique, peut-être du type « microbody » (voir texte) ; $\times 35\ 000$.

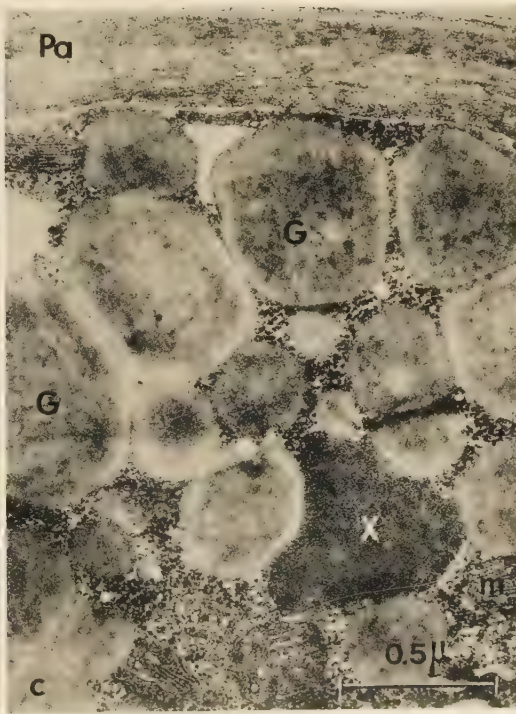
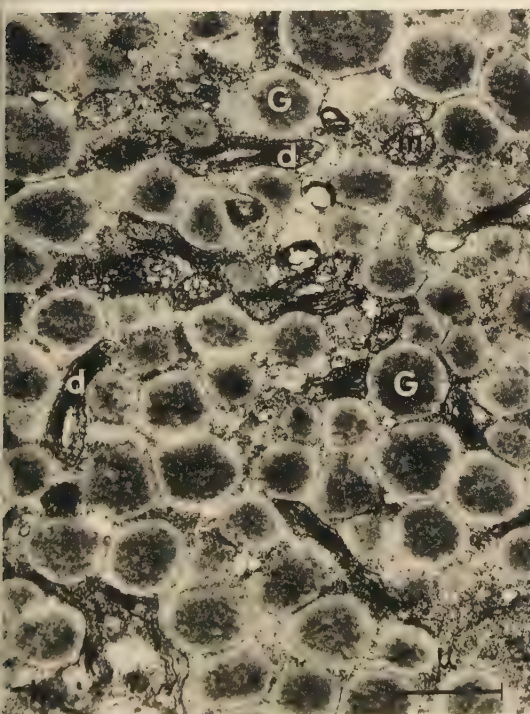


Planche II

Fig. a. — 4 à 5 jours après la levée de carence, détail de la zone médiane située entre zone globulaire (*G*) et plaste (*P*). Les noyaux (*N*) sont nombreux ainsi que les mitochondries (*m*). Plusieurs vacuoles à inclusions denses (*V* et *v*), de forme et de taille variées, sont présentes. Dans cet individu, le dépôt globulaire (*G*) apparaît formé d'un réseau irrégulier plutôt que de véritables globules ; $\times 22\ 000$.

Fig. b. -- Au même stade, coupe passant par le plan de la zone médiane. Plusieurs globules (*Gd*) présentent des aspects de début de digestion. En certains points (*flèches*), ces cavités semblent communiquer directement avec le cytoplasme. En d'autres (*double flèche*), elles en paraissent séparées par une fine pellicule dense. (*N*), noyau ; (*C*), centrosome ; (*m*), mitochondries ; (*d*), digestion plastidale ; $\times 22\ 000$.

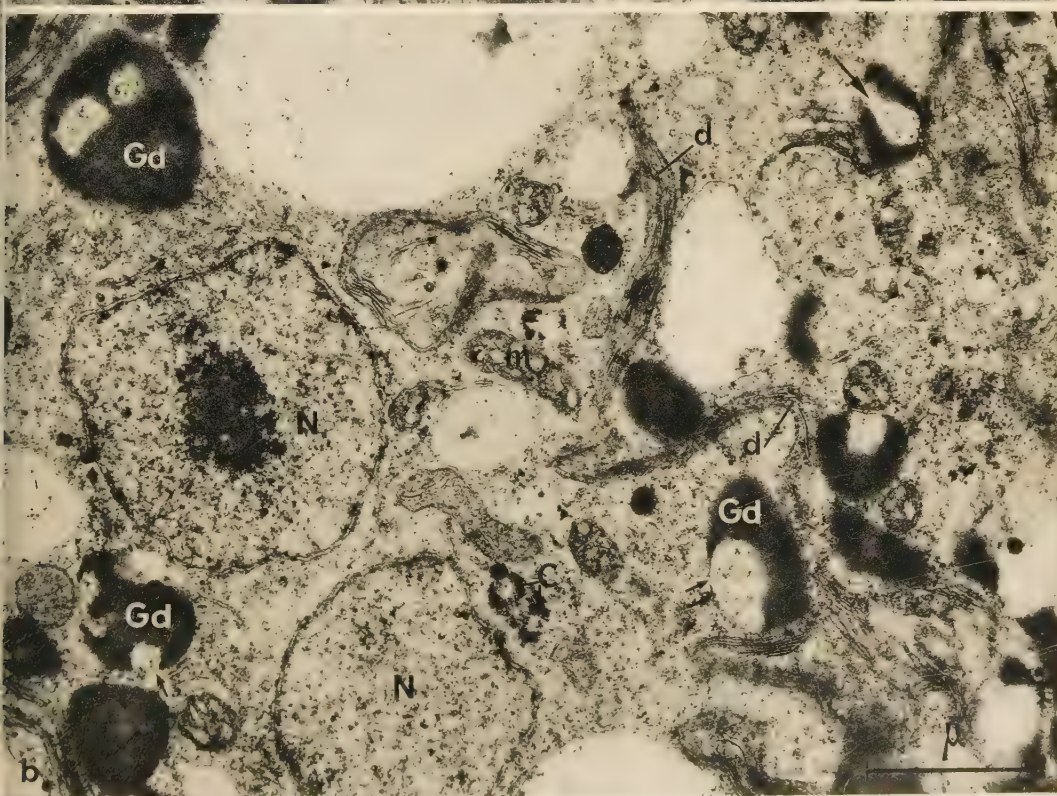
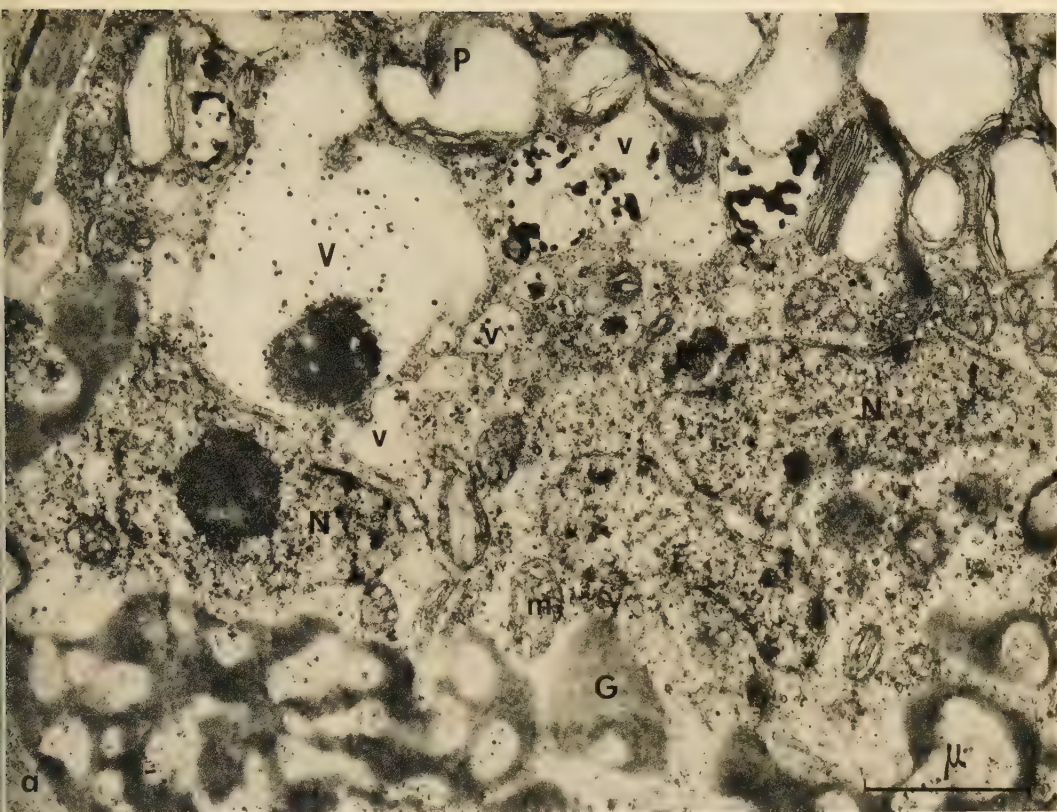


Planche III

Fig. a. — Au bout de 10 jours, le reverdissement est presque terminé. Les diverticules (*d*) du plaste (*P*) ont réenvahi à peu près toute la cellule. Les globules (*G*) sont rejetés à un pôle cellulaire. La plupart sont creusés de grosses cavités et réduits en coupe à des profils annulaires. (*N*), noyau, (*p*), pyrénioïde ; (*Pa*), paroi ; $\times 8\ 000$.

Fig. b. — Détail de la figure précédente : aspect des globules en cours de digestion (*Gd*). Certains sont réduits à des profils annulaires (*an*). (*d*), digitation du plaste ; (*re*), profil de réticulum endoplasmique longeant la membrane cytoplasmique (*mc*) ; (*Pa*), paroi ; $\times 35\ 000$.

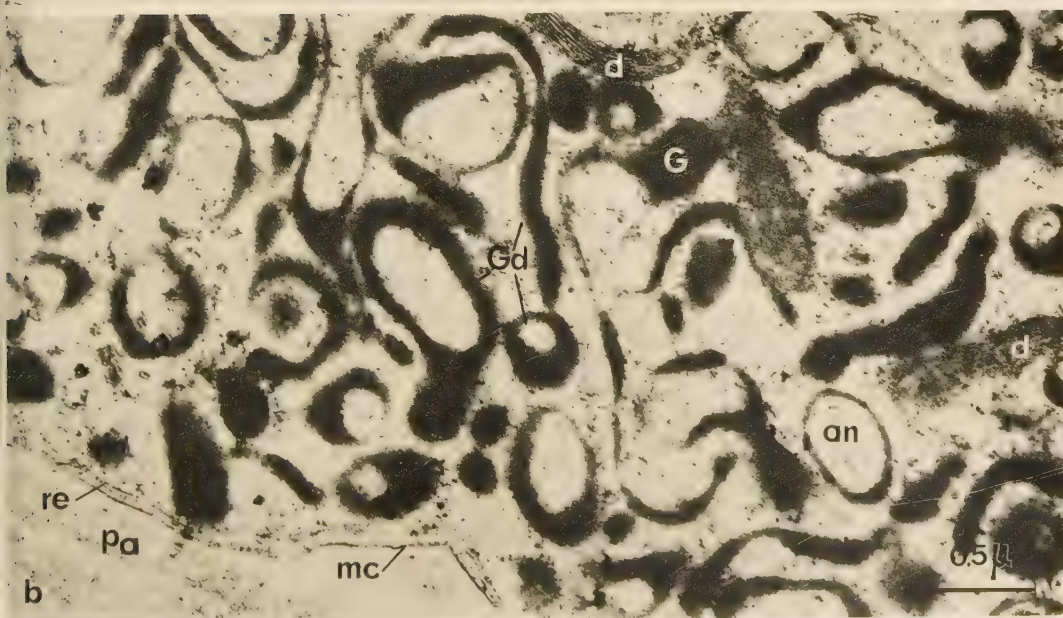


Planche IV

Fig. a. — Individu d'une culture presque entièrement reverdie. Le plaste est très développé. Il possède de nombreux pyrénoides (*p*) autour desquels est surtout localisé l'amidon (*a*). Des digitations du plaste (*d*) forment une couche presque continue à la périphérie du cytoplasme. Quelques globules, ou tout au moins leurs vestiges (*Gd*), sont encore visibles dans le cytoplasme ; (*Pa*), paroi ; $\times 12\ 000$.

Fig. b. — Détail d'un autre individu de la même culture : zone cytoplasmique riche en vestiges globulaires (*Gd*). (*re*), réticulum endoplasmique ; (*Pa*), paroi ; (*d*), digitation du plaste ; $\times 22\ 000$.

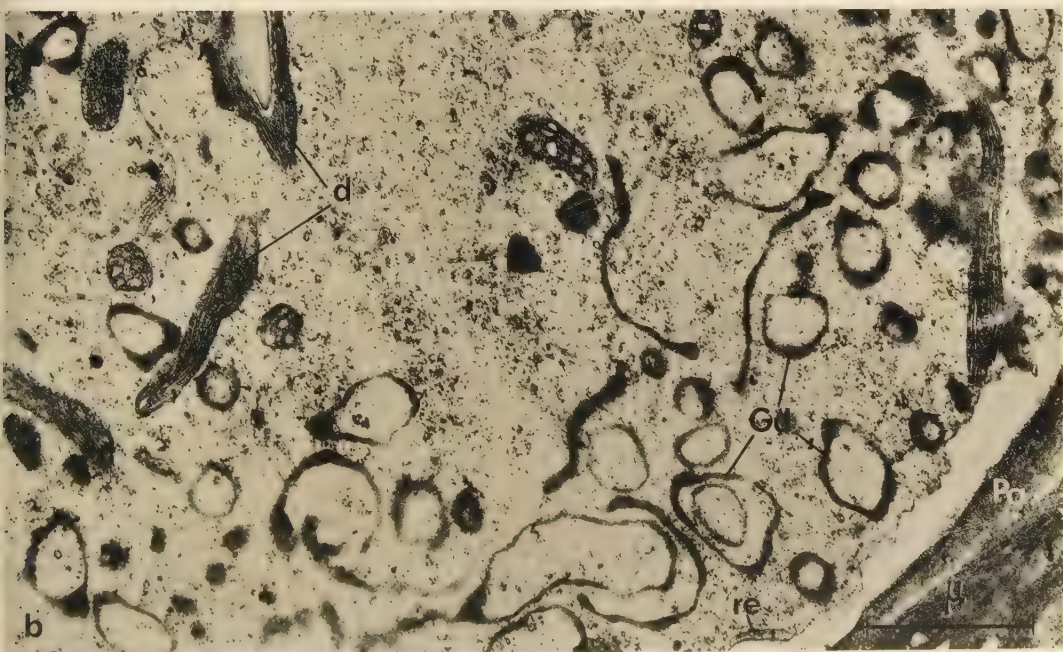
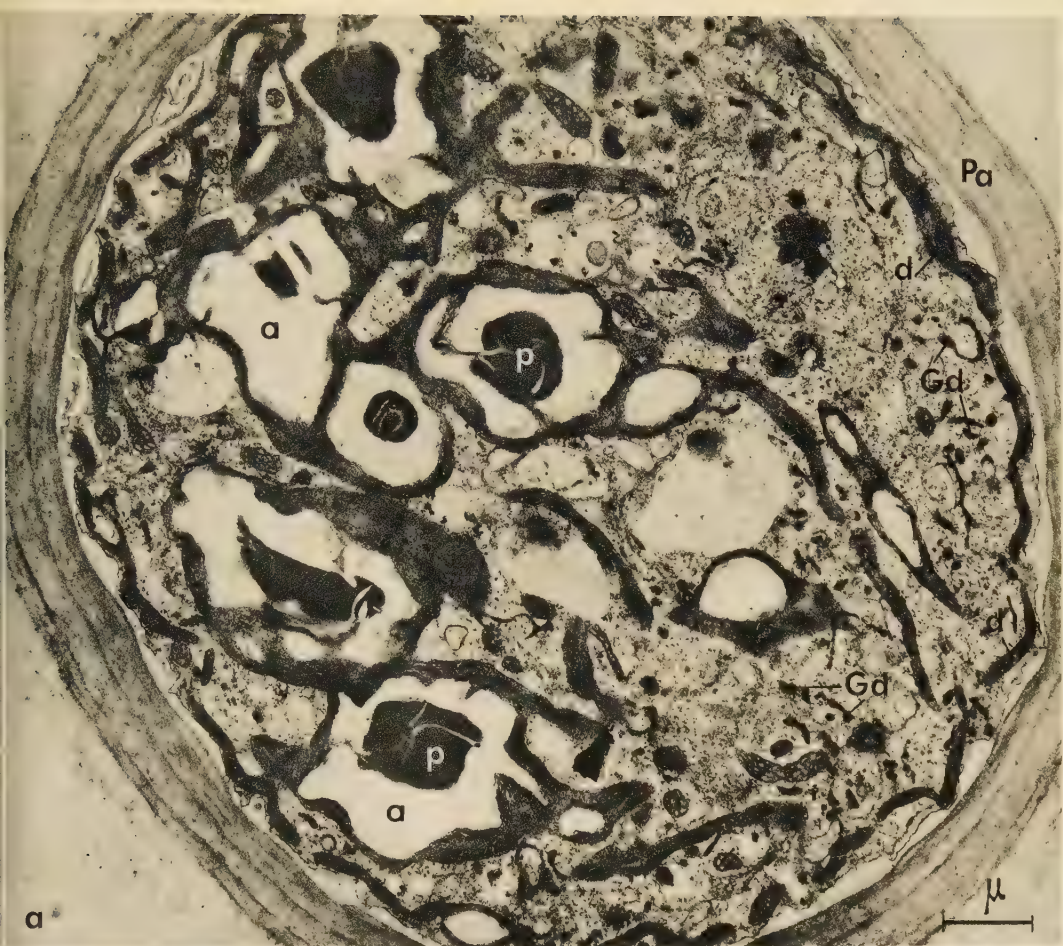


Planche V. — Détails dans des individus provenant d'une culture dont le reverdissement est terminé.

Fig. a. — La paroi « gonflée » laisse apparaître clairement son organisation en couches concentriques. La couche la plus interne contient une zone (*z*) où la disposition des fibrilles est plus orientée que dans le reste de la paroi. Les couches les plus externes (*E*) apparaissent presque entièrement dissociées. (*P*), plaste ; (*C*), cytoplasme ; $\times 27\ 000$.

Fig. b. — Les digitations du plaste sont riches en thylakoïdes longs (*t*). Les accolements membranaires sont toutefois abondants et les pseudogranums (*pg*) présents. (*G*), globule pigmenté ; (*m*), mitochondrie ; (*V*), vacuole ; (*M*), figure myélinique ; (*a*), amidon ; (*mp*), membrane limitante du plaste ; $\times 35\ 000$.

